

Aus dem Institut für Neuropsychopharmakologie
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. Helmut Coper

**UNTERSUCHUNGEN DER NADPH-ABHÄNGIGEN,
LÖSLICHEN ALDEHYD-REDUKTASE AUS
RINDERGehirn MIT VERSCHIEDENEN
SUBSTRATEN UND INHIBITOREN**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität
Berlin

vorgelegt von
Hansbernd Kuhr
aus Borgloh

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Neuropsychopharmakologie
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. Helmut Coper

UNTERSUCHUNGEN DER NADPH-ABHÄNGIGEN,
LÖSLICHEN ALDEHYD-REDUKTASE AUS
RINDERGEHIRN MIT VERSCHIEDENEN
SUBSTRATEN UND INHIBITOREN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität
Berlin

vorgelegt von
Hansbernd Kuhr
aus Borgloh

Referent: Prof. Dr. rer.nat. Wolfram Christ

Korreferent: Prof. Dr. med. Theodor Günther

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin



Promoviert am: 12. Januar 1978

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
A. <u>Einleitung</u>	3
B. <u>Material und Methodik</u>	
1. Materialien	9
2. Darstellung, Stabilität und Reinheit der NADPH-abhängigen Aldehyd-Reduktase (AR) aus Rinderhirn	12
3. Proteinbestimmung	16
4. Bestimmung der Aktivität der Rinderhirn-Aldehyd-Reduktase	19
5. Untersuchungsgang zur Einteilung der zu prüfenden Substanzen in Substrate, Nichtsubstrate und Hemmstoffe	21
6. Meßbedingungen, die Standardreaktion und Meßansätze	22
7. Theoretische Grundlagen der enzymkinetischen Reaktion	26
8. Bestimmung a) des Hemmtyps	28
b) der IC_{50} zur Prüfung auf Substrat-Hemmung	
c) der Hemmkonstanten k_i	
9. Statistische Auswertung	32
C. <u>Ergebnisse</u>	33
1. Die spezifische Aktivität der AR in den Enzymchargen	33
2. Der Mechanismus der Aldehyd-Reduktase-Reaktion	35
3. Die Substratspezifität der Rinderhirn-Aldehyd-Reduktase	41
a) 4-Nitrobenzaldehyd	
b) Dimethoxybenzaldehyde	
c) Trimethoxybenzaldehyde	
d) 4-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-oxo-3-butensäure (Tabelle A)	

e) Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten der AR bei Verwendung der verschiedenen Substrate.	
4. Hemmung der AR-Reaktion durch Nichtinhibitoren	62
5. Inhibitoren der AR mit substratähnlicher Struktur	66
a) Dihydroxybenzaldehyde	
b) 4-(3, 4-Dimethoxyphenyl)-4-oxo-buttersäure (Tabellen B und C)	
 D. <u>Diskussion</u>	 82
(Tabellen D - G)	
 E. <u>Zusammenfassung</u>	 94
 F. <u>Anhang: Tabellen 1 - 14</u>	 97 - 112
 G. <u>Verzeichnis der Abkürzungen</u>	 113
 H. <u>Literaturverzeichnis</u>	 114

A. EINLEITUNG

Die Inaktivierung der Transmittersubstanzen Noradrenalin, Dopamin und Serotonin erfolgt im ZNS durch aktiven Rücktransport in die Speicherorganellen der Neurone sowie durch Metabolisierung im Axon und im synaptischen Spalt (59). Die Enzyme, die den Abbau der biogenen Amine katalysieren, sind die Monoaminoxidase (MAO), Catecholamin-O-Methyltransferase (COMT) (32, 38, 47), die Aldehyd-Dehydrogenase und Aldehyd-Reduktase (AR). MAO und Aldehyd-Dehydrogenase sind hauptsächlich an Mitochondrien gebunden, COMT und Aldehyd-Reduktase im Cytoplasma gelöst. Die Catecholamin-O-Methyltransferase (EC 2.1.1.6.) methyliert die Catechole an der 3-O-Stellung. Die oxidative Desaminierung (MAO, EC 1.4.3.4.) (12, 49) führt zu den biogenen Aldehyden (6, 7, 51) (vgl. Abb. 1). Diese reaktiven Zwischenprodukte werden entweder durch eine NAD-abhängige Aldehyd-Dehydrogenase (EC 1.2.1.3.) (18, 20, 22, 45) zu Carbonsäuren oxidiert oder durch eine Aldehyd-Reduktase (EC 1.1.1.2.) zu den entsprechenden Alkoholen reduziert (2, 9, 27, 29, 37, 56). Die Bildung der biogenen Alkohole 3,4-Dihydroxyphenyläthanol, 3-Methoxy-4-Hydroxyphenyläthanol (30, 31, 72), 3,4-Dihydroxyphenyläthylenglycol (56), 4-Hydroxy-3-Methoxyphenyläthylenglycol (44, 58) und 5-Hydroxytryptophol (21, 58) im Gehirn ist nachgewiesen. Die höchsten AR-Aktivitäten befinden sich beim Rind und Affen in den Gehirnnarealen mit den größten Noradrenalin-konzentrationen (Medulla, Pons, Mittelhirn und Hypothalamus, 11, 61).

Im Gegensatz zur Leber hat die NAD(P)-abhängige Alkohol-Dehydrogenase (EC 1.1.1.1.) im Gehirn offenbar keine wesentliche Bedeutung, obwohl sie in geringen Mengen dort vorkommt (48, 52, 53) und biogene Aldehyde reduzieren bzw. biogene Alkohole oxidieren kann (71).

Ob der oxidative oder reduktive Abbauweg bevorzugt wird, wird offenbar von der Struktur der Aldehyde bestimmt. β -Hydroxy-substituierte Phenyläthylamine wie Noradrenalin werden in vivo und in vitro überwiegend zu Äthylenglycolen umgesetzt. Aus Dopamin, dem Phenyläthylamin ohne β -OH-Gruppe, entstehen bevorzugt die entsprechenden Phenylelessigsäure-derivate (5, 9, 16, 17, 56, 58, 61).

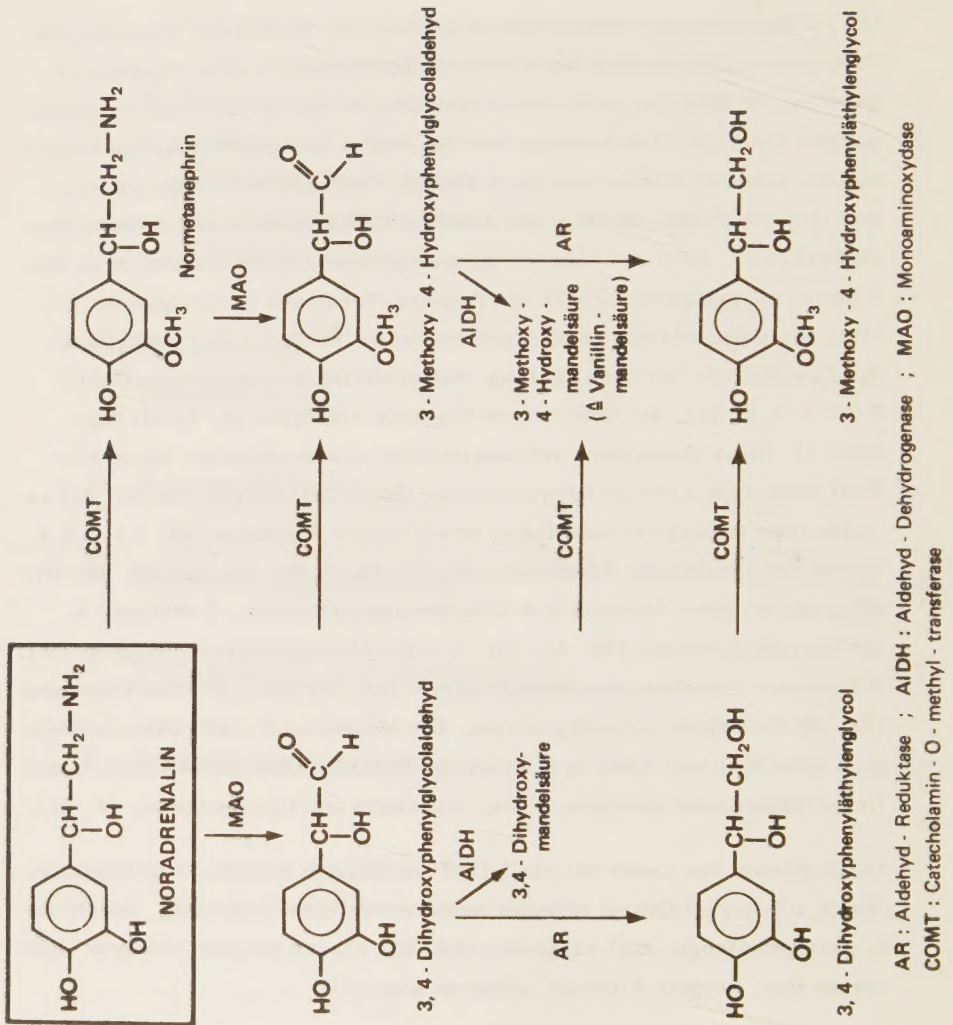
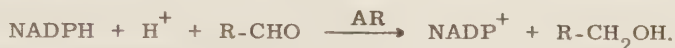


Abb. 1 : Die Stellung der Aldehyd-Reduktase im Abbauweg der Katecholamine dargestellt am Beispiel des Noradrenalin.

Die Gesamtkapazität des Rinderhirns zur Reduktion von Aldehyden wurde von TABAKOFF und ERWIN mit wenigstens 40 n Mol/Min. /g Hirnfeuchtgewicht berechnet (61), während nach ERWIN und DEITRICH die Oxidation der Aldehyde nur 16,6 n Mol/Min. /g Hirnfeuchtgewicht betragen soll (22).

Die Aldehyd-Reduktase (MG: 29-44000, 8, 11, 54, 61, 68, 69) katalysiert die Reaktion:



Das In-vitro-Reaktionsgleichgewicht befindet sich beim pH-Optimum von 5,6 (Ratte) bis 7,4 (Affe) auf der Seite der Reduktion. Das Coenzym der AR-Reaktion ist NADPH. NADH wird, wenn auch wesentlich langsamer, ebenfalls umgesetzt (24, 33, 54, 61, 69). Der mit der AR aus menschlichem Gehirnenzym bestimmte k_m -Wert für NADH von $530 \mu\text{M}$ (55) spricht allerdings dafür, daß dieses Coferment für die AR-Reaktion in vivo keine Bedeutung hat.

Seit der Isolierung und Beschreibung einer teilgereinigten Aldehyd-Reduktase aus Rinderhirn durch TABAKOFF und ERWIN (1969) (61, 63) wurde das Enzym aus den Gehirnen verschiedener Spezies gewonnen: Schwein (68), Affe (11), Ratte (54, 62, 69), Kaninchen (8) und Schaf (70). RIS und VON WARTBURG (54) isolierten 1973 aus menschlichen Gehirnen 4 Isoenzyme und aus Rattengehirnen 2 Isoenzyme, nachdem 1972 TURNER und TIPTON (69) und ERWIN et al. (24) schon zwei Isoenzyme aus Schweinehirn und aus Rinderhirn beschrieben hatten. Die Isoenzyme lassen sich durch Substrat- und Inhibitorspezifität sowie durch verschiedene Umsatzraten charakterisieren ("high- und low- k_m -AR"). Die quantitativ größten Isoenzymfraktionen wie die high- k_m -AR-Fraktion stellen den Hauptanteil der Gesamtaktivität dar und besitzen die höchsten spezifischen Aktivitäten. Inwieweit mit den einzelnen Isoenzymen verschiedene Stoffwechselaufgaben verbunden sind, ist bisher unbekannt.

In-vitro-Untersuchungen zur Substratspezifität mit physiologischen und unphysiologischen Substanzen (11, 54, 61, 64, 68, 69) zeigen, daß neben einigen aliphatischen eine große Anzahl aromatischer Aldehyde durch das Hirnenzym reduziert wird.

Acetaldehyd, Propionaldehyd, Butyraldehyd, Decanaldehyd, Palmitylaldehyd, Lactaldehyd und Glyceraldehyd besitzen höhere Michaelis-Konstanten und werden im Vergleich zu den aromatischen Verbindungen (substituierte Benzaldehyde und einige Aldehydderivate der Phenyläthylamine) langsamer umgesetzt. Dabei sind offenbar die längerkettigen Aliphate die bevorzugten Substrate. Die Annahme als Substrat scheint auch von der Herkunft des Enzyms und der Spezifität der einzelnen Isoenzyme abhängig zu sein. Die Isoenzyme des Ratten- und Menschengehirns reduzieren mit einem unterschiedlichen Umsatzmuster sowohl die aliphatischen als auch die aromatischen Substrate.

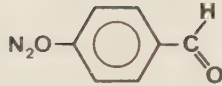
In der vorliegenden Arbeit werden enzymkinetische Untersuchungen mit der teilgereinigten NADPH-abhängigen Aldehyd-Reduktase aus Rindergehirn beschrieben.

Sie enthalten:

1. Bestimmung der Michaelis-Konstanten für NADPH als Coenzym und 4-Nitrobenzaldehyd (4-NBA) als Substrat der AR-Reaktion.
2. Untersuchungen zum Mechanismus der AR-Reaktion bei Verwendung von NADPH und 4-NBA als Substrate.
3. Prüfung einiger -OH und -OCH₃-substituierter Benzaldehyde (siehe Abb. 2) auf Substrat- und Inhibitoreigenschaft mit Bestimmung der Michaelis- und Hemmkonstanten und Festlegung des Hemmtyps der Verbindungen.
4. Prüfung zweier aromatischer Ketosäuren (siehe Abb. 2) auf Substrat- und Inhibitoreigenschaft (wie 3.).

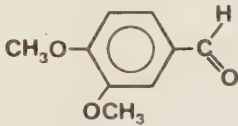
Die Untersuchungsergebnisse werden unter Berücksichtigung der Heterogenität des Enzyms und der Stereoisomerie der Substituenten am aromatischen Ring dargestellt und diskutiert.

Vergleichssubstanz:



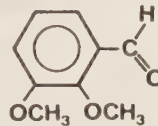
MG: 151,123

4-Nitrobenzaldehyd

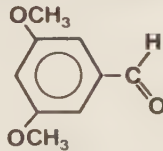


3,4,-Dimethoxybenzaldehyd
(Veratrumaldehyd)

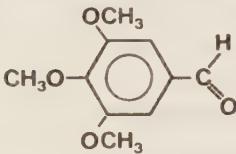
MG: 166,179



2,3-Dimethoxybenzaldehyd

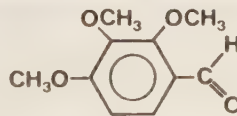


3,5-Dimethoxybenzaldehyd

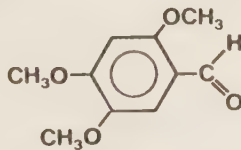


3,4,5,-Trimethoxybenzaldehyd

MG: 196,202

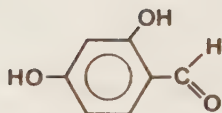


2,3,4-Trimethoxybenzaldehyd

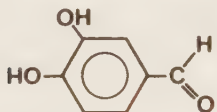


2,4,5-Trimethoxybenzaldehyd

Abb. 2: Strukturformeln und Molekulargewichte der Testsubstanzen

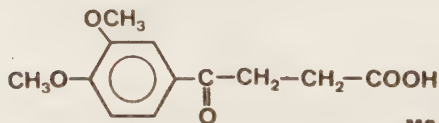


2,4-Dihydroxybenzaldehyd



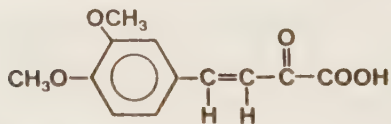
MG: 138,124

3,4-Dihydroxybenzaldehyd



MG: 238,243

4-(3,4-Dimethoxyphenyl) 4-oxo-buttersäure



MG: 236,227

4-(3,4-Dimethoxyphenyl) 2-oxo-3-butensäure

B. MATERIAL UND METHODIK

1. Materialien

- a) Das Enzym Aldehyd-Reduktase wurde nach der im Abschnitt B. 2. erläuterten Methode selbst hergestellt.
- b) Das Coenzym NADPH: Fa. Boehringer Mannheim GmbH und Fa. Sigma, Missouri/USA.
- c) Die Testsubstanzen:
 - 2, 4-3, 4-Dihydroxybenzaldehyde, 2, 3-3, 4-3, 5-Dimethoxybenzaldehyde, 4-(3, 4-Dimethoxyphenyl)4-oxo-buttersäure, 4-(3, 4-Dimethoxyphenyl)-2-oxo-3-butensäure: Fa. Schering AG, Berlin.
 - 3, 4-Dimethoxybenzaldehyd (Veratrumaldehyd), 4-Nitrobenzaldehyd: Fa. E. Merck AG, Darmstadt.
 - 3, 4, 5-Trimethoxybenzaldehyd: Fa. Aldrich-Chemicals Co. Inc., Milwaukee/USA.

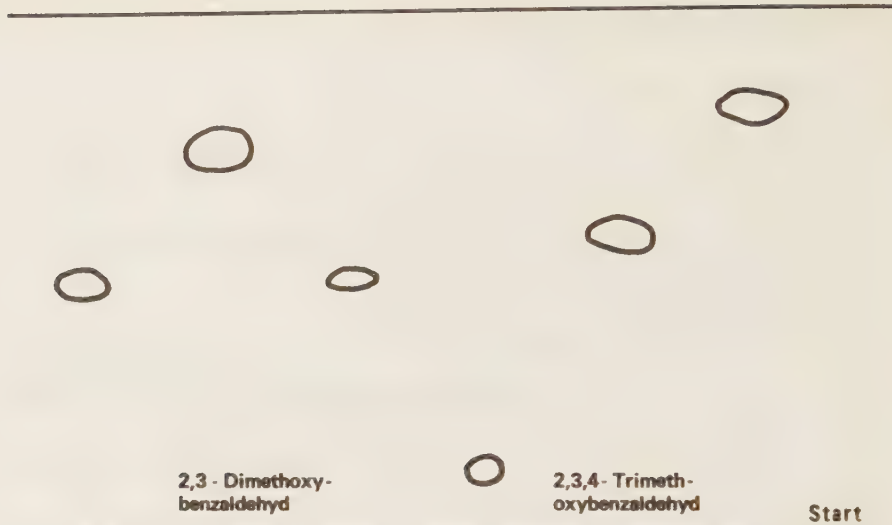
Die Testsubstanzen wurden zur Kontrolle ihrer chemischen Reinheit durch Dünnschichtchromatographie auf DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ (Fa. E. Merck, Darmstadt) mit dem Fließmittel Benzol/Essigsäureäthylester/Eisessig (90:5:5/2 Std. Laufzeit) geprüft.

Mit Ausnahme der 4-(3, 4-Dimethoxyphenyl)-2-oxo-3-butensäure, die auf der Startlinie liegenbleibt, werden alle Substanzen durch das Fließmittel auf der Dünnschichtplatte entwickelt. Bei keiner der eingesetzten Verbindungen wurde eine Auftrennung in mehrere UV-absorbierende Flecken beobachtet (Abb. 3). Verunreinigungen liegen unter 2 %.

Da die Chromatographie als Kontrolle am Ende der Untersuchungen durchgeführt wurde, ist die ausreichende Reinheit während des Verwendungszeitraumes nachgewiesen.

- d) Alle anorganischen und organischen Salze, die Fließmittel zur Dünnschichtchromatographie, Methanol zur Spektroskopie (Uvasol): Fa. E. Merck, Darmstadt.
- Triäthanolamin-HCl-Substanz: Fa. Boehringer Mannheim GmbH.
- Dithiothreitol (Clelands Reagenz): Fa. Calbiochem, San Diego,

Front



Front

2,4 - Dihydroxy-
benzaldehyd

2,4,5 - Trimeth-
oxybenzaldehyd

3,4 - Di -
hydroxy-
benzaldehyd

3,5 - Dimethoxy -
benzaldehyd

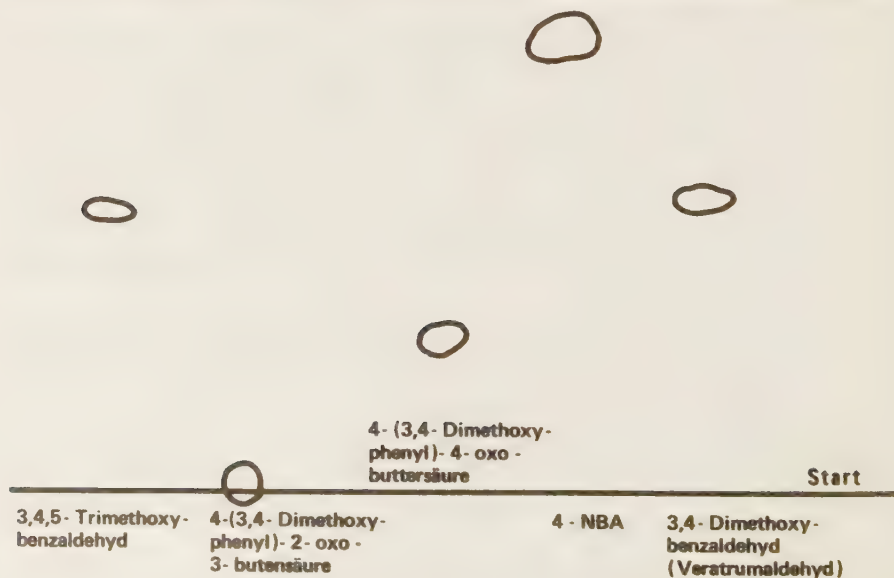


Abb. 3: Dünnschichtchromatographie der Testsubstanzen

Calif. /USA.

Mercaptoäthanol, Tris-Substanz, EDTA-Substanz, Folin-Reagenz:
Fa. E. Merck, Darmstadt.

Rinderserumalbumin: Fa. Behring-Werke, Marburg/Lahn.

- e) Phosphat-Puffer (0,1 M/pH 7,4) zur Enzympräparation:

In 1 l Puffer waren 182 ml der 0,1 M KH_2PO_4 -Lösung (13,6 g/l H_2O) und 818 ml der 0,1 M Na_2HPO_4 -Lösung (197,8 g/l H_2O) enthalten.

- f) Phosphat-Puffer (0,1 M/pH 7,0) als Lösungs- und Verdünnungsmittel und als Meßpuffer:

In 1 l Puffer waren 388 ml der 0,1 M KH_2PO_4 -Lösung (13,6 g/l H_2O) und 612 ml der 0,1 M Na_2HPO_4 -Lösung (17,8 g/l H_2O) enthalten.

- g) Tris-Puffer (0,05 M/pH 7,4) als Lösungsmittel für das Coenzym NADPH:

6,05 g Tris-Substanz (Trishydroxymethylaminomethan, MG: 121,14) wurde in 1 l H_2O aufgelöst und dabei mit 1-n HCl am pH-Meter auf den pH-Wert 7,4 eingestellt.

- h) Dialyse-Puffer nach Turner und Tipton (69):

Triäthanolamin-Hydrochlorid-Lösung (0,01 M/pH 7,7):

Auf 2 x 5 l H_2O wurden je 9,285 g Triäthanolamin-HCl-Substanz (MG: 187,5) gegeben und die Lösungen am pH-Meter mit 1-n NaOH-Lösung auf pH 7,7 eingestellt.

Unmittelbar vor der Dialyse wurde den Puffer-Lösungen hinzugefügt:

- 25 ml einer 10^{-2} M EDTA-Stammlösung
(372 mg/100 ml H_2O , Endkonzentration im Puffer: 0,05 M).
- 0,176 ml Mercaptoäthanol-Lösung (MG: 78,13;
Dichte: 1,11 g/ml, Endkonzentration im Puffer: 0,5 mM).

2. Darstellung (a), Stabilität (b) und Reinheit (c) der NADPH-abhängigen Aldehyd-Reduktase aus Rinderhirn (EC: 1.1.1.2. Alkohol: NADP oxidoreduktase)

- a) Die Präparation erfolgte nach der Methode von TABAKOFF und ERWIN (61) in der Modifikation von TURNER und TIPTON (69).

Die im Schlachthof frisch entnommenen Rinderhirne wurden nach dem Transport in Eis sofort im Kühlraum bei +2 bis +6°C verarbeitet.

Nach Entfernung der Hirnhäute, Blutgefäße und des geronnenen Blutes wurde das Gehirn im Verhältnis 1 : 1 mit Phosphat-Puffer (0,1 M / pH 7,4), der Dithiothreitol- und EDTA in einer Endkonzentration von $5 \cdot 10^{-4}$ M bzw. $5 \cdot 10^{-5}$ M enthielt, versetzt.

Die weiteren Arbeitsgänge im einzelnen:

- Homogenisieren eine Minute lang in einem Mixer ("Starmix", Fa. Elektrostar) auf höchster Stufe.
- Zentrifugieren des Homogenates in einer MSE-Kühlzentrifuge 30 Minuten bei 37000 g.
- Zum rosa gefärbten Überstand Zugabe von kristallinem Ammonium-Sulfat unter ständigem Rühren, um eine relative Ammonium-Sulfat-Sättigung von 40 % ($\hat{=}$ 24,3 g Ammonium-Sulfat/100 ml Überstand) zu erreichen. Anschließend Rühren für 30 Minuten mit einem Glasrührer (2000 U/Min.).
- Abtrennung des ausgefallenen Proteins durch Zentrifugieren bei 27 000 g für 20 Minuten.
- Zugabe von kristallinem Ammonium-Sulfat zum Überstand bis zu einer relativen Endsättigung von 55 % ($\hat{=}$ 9,7 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /100 ml Überstand). Anschließend für 30 Min. Rühren.
- Zentrifugieren 20 Min. bei 40 000 g und Verwerfen des Überstandes.
- Überführen des Präzipitates in einen Kunststoff-Homogenisator nach Potter-Elvehjem, wobei zur Überspülung der festgesetzten Niederschlagsreste der Phosphat-Puffer (0,1 M/pH 7,4) im Volumen von 3 ml pro 100 g Hirnfeuchtgewicht benutzt wurde. Kurzes Homogenisieren von Niederschlag und Phosphat-Puffer.

- Dialyse des Homogenates in einem Dialyseschlauch, der vorher 5 Std. in Phosphat-Puffer (0,1 M/pH 7,4) gequollen hatte: der Schlauch hängt dabei - beschwert durch einen Glasstopfen und durch einen Magnetrührer in leichter Bewegung gehalten - zunächst 4 Std. und dann 14 Std. in je 5 l des Dialysepuffers, wobei sich das Homogenatvolumen etwa verdoppelt.
- 4. Zentrifugation in der Spinco L 50-Kühlzentrifuge für 1 Std. bei 164 000 g zur Abtrennung der unlöslichen Proteine.

Der Überstand repräsentiert das lösliche Enzymprotein.

In der Tab. 2 (s. Anhang) sind die erhaltenen Volumina der Enzym-lösungen nach der Dialyse verzeichnet. In Portionen zu 2 ml werden sie eingefroren und als Enzymquelle benutzt.

Auf eine weitere Reinigung des Enzyms, die zwar eine Erhöhung der spezifischen Aktivität zur Folge haben würde, wurde verzichtet, weil dieses die mengenmäßige Ausbeute sowie die Stabilität des Präparates erheblich verringert hätte (61).

- b) Turner und Tipton geben an, daß das teilgereinigte und tiefgefrorene Enzym bis zu 3 Monaten haltbar ist. Abb. 4 bestätigt diesen Befund. Die Umsatzgeschwindigkeiten weichen nach 2 Monaten nicht wesentlich von denjenigen der frisch gewonnenen Präparation ab.

Weiter wurde beobachtet, daß ein Wiedereinfrieren einer aufgetauten Charge sowie die Aufbewahrung bei $+4^{\circ}\text{C}$ über 2 - 3 Tage die Aktivität des Enzyms nicht beeinflusst.

Auch Verdünnen der Enzymlösung mit dem Phosphatpuffer (0,1 M / pH 7,0) bis zu 40 % verringert die Aktivität nicht.

- c) Die Enzymaktivitätsmessungen basieren auf einer Extinktionsabnahme infolge der Oxidation des Coenzym NADPH.

Reaktionsverfälschungen seitens einer zusätzlichen Oxydierung des NADPH durch ein anderes Enzym konnte aufgrund der Extinktionskonstanz einer nur aus NADPH und dem Enzympräparat angesetzten Meßlösung ausgeschlossen werden, wurde aber für jeden Meßansatz vor dem Start der Reaktion erneut überprüft.

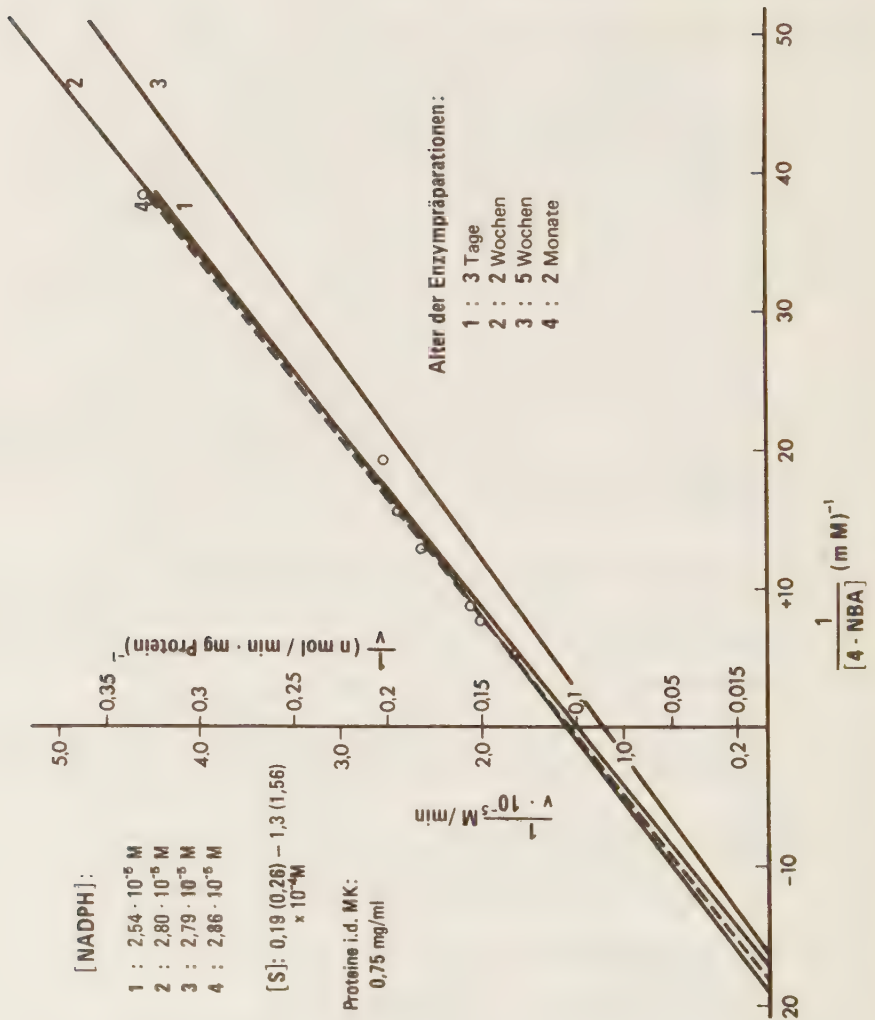


Abb. 4: Die Reproduzierbarkeit von Meßreihen mit gleichen Reaktionspartnern über ein Zeitraum von 2 Monaten: doppelt reziprokes Diagramm der 4-NBA-Reduktion bei gleichen NADPH-Konzentrationen ($2,75 \pm 0,15 \times 10^{-5}$ M). Die Geraden 1, 3 und 4 sind den Abbildungen 12 (Symbol $\circ$), 25 A (Symbol $\bullet$) und 26 A (Symbol $\bullet$) entnommen. Die Gerade 2 stellt eine zusätzliche Messung dar.

Eine andere denkbare Störmöglichkeit wäre die Rückreaktion durch Oxidoreduktasen, die NADP in Gegenwart von geeigneten Substraten zu reduzieren vermögen.

In der teilgereinigten Enzympräparation wurden auch folgende Enzyme nachgewiesen: 6-Phospho-Gluconat-Dehydrogenase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und Isocitrat-Dehydrogenase (13). Doch sind die in dieser Arbeit untersuchten Substanzen für die genannten Fermente keine Wasserstoffdonatoren. Eine unspezifische Aldehyd-Dehydrogenase, die die Testsubstanzen zu den entsprechenden Säuren oxidieren könnte, ist an Mitochondrien gebunden und außerdem NAD-abhängig (20, 22).

3. Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration des Enzympräparates wurde nach der Methode von LOWRY et al. (18) bestimmt.

Diese Technik verbindet die einfache, aber unempfindlichere Biuret-Methode mit der 100fach empfindlicheren nach Folin-Ciocalteu (26).

Die Bestimmung beruht darauf, daß das Phenolreagenz nach Folin in Gegenwart von Kupferionen mit phenolgruppenhaltigen Aminosäuren (wie Tyrosin u. a.) eine blau-violette Färbung der Lösung hervorruft, die kolorimetrisch bei 750 nm gemessen wird.

Durchführung

0,25; 0,5; 1,0 ml der drei Verdünnungsstufen (1 : 50 ; 1 : 100 ; 1 : 200) der Enzymproteinlösung werden jeweils mit 1 ml einer frisch hergestellten Lösung aus 50 ml 2 %iger Na_2CO_3 -Lösung in 0,1-n NaOH und 1 ml einer 1 %igen CuSO_4 -Lösung in 2 % Kaliumtartrat versetzt und der Ansatz auf 10 ml mit aqua dest. aufgefüllt. Anschließend wird jeder Verdünnung 0,1 ml Folin-Reagenz (1 : 1 mit aqua dest. verdünnt) zugegeben. Nach 45 Minuten wird am Spektralphotometer (Fa. Zeiss, Modell PM Q II) die Extinktion der inzwischen blau gefärbten Lösung bei 750 nm gemessen. Gleichzeitig wird mit den gleichen Reagenzien eine Eichreihe aus Rinder-serumalbumin (10 mg in 100 ml H_2O) zum Vergleich hergestellt und die Proteinkonzentration der Enzympräparation nach Aufzeichnen der Eichkurve graphisch bestimmt, wobei die Verdünnungsfaktoren in die Rechnung mit eingehen (vgl. Tab. 1 im Anhang und Abb. 5).

Die Abweichungen der Extinktionsmeßwerte für die Eichkurve liegen bei etwa ± 10 Prozent. In dem dargestellten Beispiel enthält die Enzymlösung $35,0 \pm 2,3$ mg Protein pro ml ($n = 6$, vgl. Tab. 2).

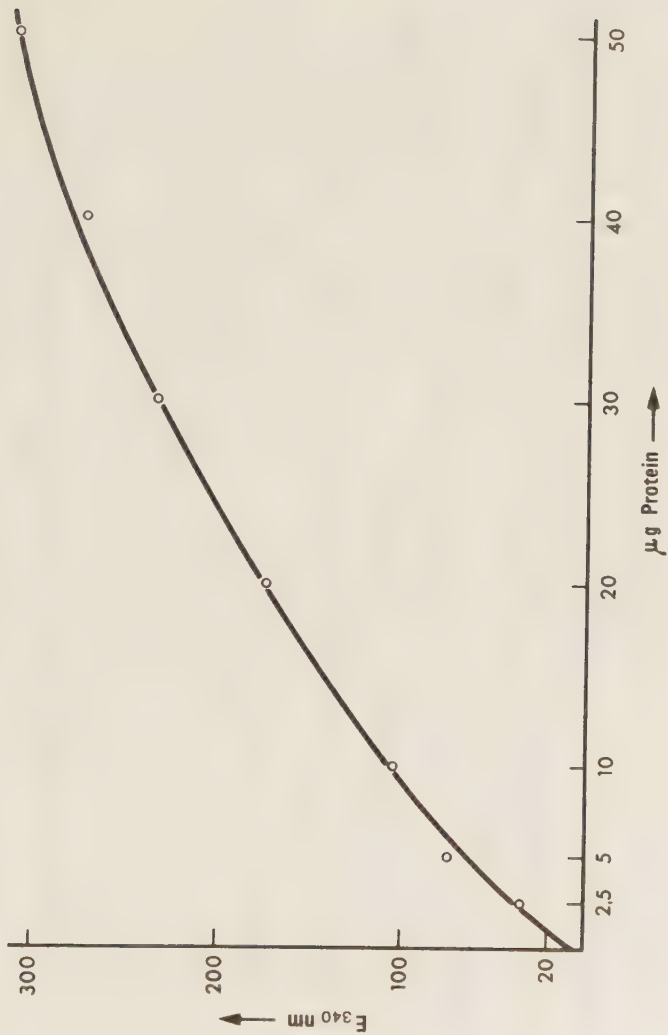


Abb. 5 : Beispiel einer Eichkurve zur photometrischen Proteinbestimmung

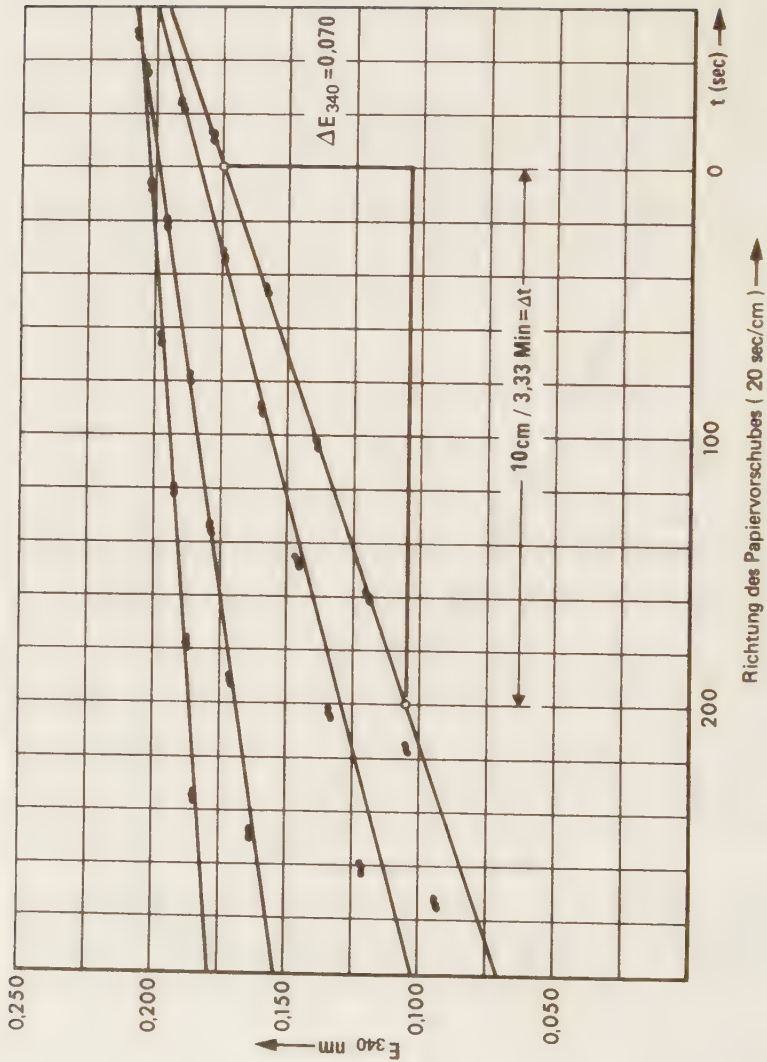


Abb. 6 : Die graphische Ermittlung der Extinktionsdifferenz ΔE bei 340 nm anhand des Meßschreiberblattes

4. Bestimmung der Aktivität der Rinderhirn-Aldehyd- Reduktase

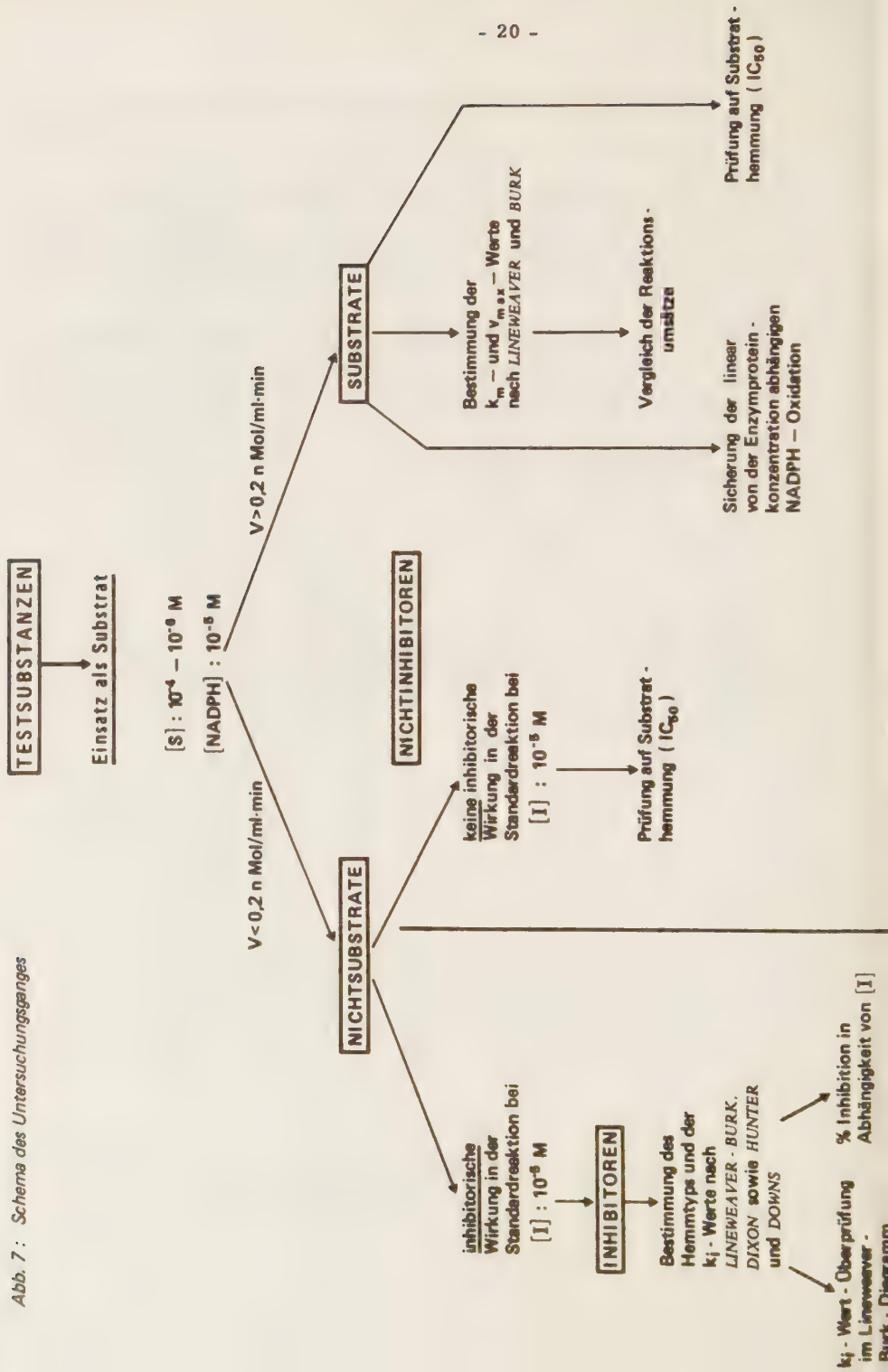
Durch die Lichtabsorption des Coenzym NADPH bei 340 nm kann die Aktivität der AR quantifiziert werden, denn die Extinktionsabnahme bei 340 nm ist ein direktes Maß für die pro Zeiteinheit umgesetzte Menge an Coenzym oder Substrat.

Die Extinktionsänderung wurde bis zu 5 Minuten aufgezeichnet (vgl. Abb. 6). Sie ergibt im Idealfall eine Gerade, deren Steigung ein Maß für die Umsatzgeschwindigkeit v des Cosubstrates ist. Da die Zeit-Umsatz-Beziehung in der Regel aber eine flache Kurve war, wurde deren Steigung durch Anlegen einer Tangente ermittelt.

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{\Delta E_{340}}{\Delta t} \hat{=} v \left(\frac{\text{Mol}}{\text{ml} \cdot \text{min}} \right).$$

In die Berechnung der Umsatzgeschwindigkeit (vgl. Tab. 3) geht der molare Extinktionskoeffizient $\epsilon = 6,22 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$ für NADPH bei 340 nm (60) mit ein.

Abb. 7: Schema des Untersuchungsganges



5. Untersuchungsgang zur Einteilung der zu prüfenden Substanzen in Substrate, Nichtsubstrate und Hemmstoffe (vgl. Abb. 7)

Um zu entscheiden, ob die zu untersuchenden Substanzen Substrate oder Hemmstoffe sind, wurde in Vorversuchen die Enzymaktivität mit jeder Verbindung in 6 verschiedenen Konzentrationen ($1 \mu\text{M}$ bis 1 mM) bei konstantem Enzymprotein ($0,75 \text{ mg/ml}$) und zwei verschiedenen NADPH-Konzentrationen ($2,75$ bzw. $5,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) gemessen.

Verbindungen, mit denen eine Umsatzgeschwindigkeit für NADPH von $v = 0,2 \text{ nMol/ml} \cdot \text{min}$ erreicht wurde, galten als Substrate und wurden den folgenden Untersuchungen unterzogen:

- Prüfung auf Linearität der NADPH-Oxidation in Abhängigkeit von der eingesetzten Enzymmenge
- Ermittlung der Michaelis-Konstanten und des v_{max} -Wertes
- Prüfung auf Substrathemmung.

Substanzen, die eine Umsatzgröße von $0,2 \text{ nMol/ml} \cdot \text{min}$ nicht erreichten ("Nichtsubstrate"), wurden auf inhibitorische Wirkung gegenüber 4-NBA nach Abschnitt B.8. geprüft.

Da 4-(3,4-Dimethoxyphenyl)-4-oxo-buttersäure als Hemmstoff und 4-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-oxo-3-butensäure als Substrat der Aldehyd-Reduktase schon bekannt waren (13), wurden mit diesen Verbindungen keine Vorversuche durchgeführt.

6. Meßbedingungen (a), die Standardreaktion (b) und Meßansätze (c)

- a) Alle Messungen wurden am Ultraviolett-Spectrophotometer "Pye Unicam SP 1700" mit thermostatisierter Küvettenwechselautomatik durchgeführt, so daß bis zu 4 Ansätze in Quarzküvetten (Volumen: 3 ml, Schichtdicke: 1 cm) bei konstanter Temperatur (25°C) nebeneinander gemessen werden konnten. Die Restrierung des Reaktionsablaufes erfolgte während ca. 5 Minuten durch einen angeschlossenen, geeichten Schreiber mit definierter Papiervorschubgeschwindigkeit. Es wurde immer der gleiche Reaktionszeitraum ausgewertet. ΔE_{340} -Meßwerte kleiner als 0,004 wurden nicht gewertet. Der Unterschied der Meßwerte für ΔE_{340} sollte mindestens 0,0005 sein. Der Puffer war auf $25 \pm 1^\circ\text{C}$ temperiert, während die NADPH-Stammlösung und die frisch aufgetaute Enzymlösung stets im Eisbad standen. Das Mischen der Reaktionspartner in der Meßküvette erfolgte mit einem Plastikrührer. Die Reaktion wurde nach Feststellung der Extinktionskonstanz entweder mit der Zugabe des Substrates oder des Coenzyms gestartet.

Methanol bis 10 % des Meßvolumens in der Küvette beeinträchtigt nach Tabakoff und Erwin (61) die Reaktionsgeschwindigkeit nicht.

Die verwendeten NADPH-Stammlösungen, die täglich neu angesetzt wurden, enthielten stets: 5,18 mg/3 ml Tris-Puffer (0,05 M/pH 7,4). Die NADPH-Konzentrationen wurden nach dem für monochromatische Lichtabsorption geltenden Lambert-Beer-Gesetz bestimmt:

$$c = \frac{E_{340}}{\epsilon \cdot d} \quad \text{Darin bedeutet:}$$

c = die Konzentration der absorbierenden Substanz (Mol/ml)

E_{340} = die bei 340 nm gemessene Extinktion, d. i. der Logarithmus des reziproken Wertes der Lichtdurchlässigkeit (Transmission) der Testlösung.

ϵ = der molare Extinktionskoeffizient für NADPH bei 340 nm: $6,22 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$

d = die Schichtdicke der durchstrahlten Lösung = 1 cm.

Als Mittel aller Bestimmungen ergab sich $2,8 \pm 0,25 \cdot 10^{-5}$ Mol/ml NADPH in der Meßküvette ($n = 63$).

Die Referenzküvette enthielt stets 0,1 ml Enzymlösung und die aktuelle Coenzymkonzentration sowie eine mittlere Substratkonzentration ad 3 ml Phosphat-Puffer. Außer den unter c) genannten variablen Reaktionspartnern wurde in die Meßküvette konstant 0,1 ml Enzymlösung (22,5/ 26,0/ 35,0/ 27,0 mg Protein pro ml Stammlösung) ad 3 ml Phosphat-Puffer (0,1 M/pH 7,0) gegeben.

- b) Aus den Erfahrungen von Vorversuchen leiteten sich die Konzentrationen der Standard-Reaktion ab, die u. a. zur Bestimmung einer halbmaximalen Reaktionshemmung eingesetzt wurde (vgl. Abschnitt B. 8b):

- 0,05 ml NADPH-Stammlösung (s. o.) $\hat{=}$ $2,8 \pm 0,25 \cdot 10^{-5}$ M
 - 0,10 ml Enzymlösung ($27,6 \pm 6$ mg Protein/ml)
 - 0,05 ml 4-NBA-Stammlösung (2,95 mg/0,5 ml Methanol
+ 4,5 ml Phosphat-Puffer) $\hat{=}$ $6,5 \cdot 10^{-5}$ M
- ad 3 ml Mk-Inhalt.

- c) Die Bereiche der einzusetzenden (Co-)Substrat- bzw. Inhibitorkonzentrationen der folgenden Testansätze waren ebenfalls in Vorversuchen ermittelt worden.

In verschiedenen Meßreihen variierte die Konzentration der zu testenden Substanz, die des Enzyms bzw. Coenzyms blieb konstant. Die einzelnen Reihen unterschieden sich jedoch durch den eingesetzten, pro Reihe gleichen Coenzymgehalt.

Zur Bestimmung des k_m -Wertes für NADPH gegenüber 4-NBA wurde bei unveränderter 4-NBA-Konzentration die Coenzymmenge variiert. Die Untersuchungen mit den Hemmstoffen wurden bei konstanter Inhibitorkonzentration durchgeführt.

Tabelle 3 faßt in einem Beispiel die Meß- und Berechnungsergebnisse für eine ungehemmte und eine gehemmte Reaktion zusammen und enthält die Daten zu der in den Abschnitten B. 7. und 8. aufgezeichneten graphischen Auswertung.

Ansätze mit dem Vergleichssubstrat 4-NBA und NADPH

(vgl. Tabellen 5, 6)

- a) - 0,02 - 0,10 ml NADPH-Stammlösung (s. o.)
 - 0,1 ml 4-NBA-Stammlösung: 2,95 mg pro 0,5 ml Methanol
+ 2,5/ 4,5/ 6,5/ 8,5/ 10,5 ml Phosphat-Puffer
(0,1 M/pH 7,0).
- b) - 0,02 - 0,15 ml 4-NBA-Stammlösung:
 - 2,95 mg/0,5 ml Methanol + 4,5 ml Phosphat-Puffer
(w. o.)
 - 0,03/ 0,05/ 0,07/ 0,10 ml NADPH-Stammlösung

Ansätze mit verschiedenen Testsubstraten (vgl. Tabellen 7 - 11)

- a) - 0,1 - 0,5 ml 3,4-Dimethoxy-benzaldehyd aus 5 Stammlösungen:
 - 0,03/ 0,3/ 3,0/ 6,0/ 12,0 mg pro 0,5 ml Methanol
+ 25 ml Phosphat-Puffer
 - 0,05/ 0,07/ 0,10 ml der NADPH-Stammlösung
- b) - 0,01 - 0,3 ml 2,3-Dimethoxybenzaldehyd-Stammlösung:
 - 9 mg/ 0,5 ml Methanol + 8,5 ml Phosphat-Puffer
 - 0,01/ 0,02/ 0,05/ 0,10 ml der NADPH-Stammlösung
- c) - 0,05 - 0,45 ml 3,5-Dimethoxybenzaldehyd-Stammlösung:
 - 0,3/ 3,0/ 6,0 mg pro 0,5 ml Methanol + 2,5 ml Phosphat-Puffer
 - 0,02/ 0,05/ 0,08/ 0,12 ml der NADPH-Stammlösung.
- d) - 0,05 - 0,5 ml 3,4,5-Trimethoxybenzaldehyd-Stammlösung:
 - 0,3/ 3,0/ 8,0 mg pro 0,5 ml Methanol + 2,5 ml
Phosphat-Puffer
 - 0,02/ 0,05/ 0,10 ml NADPH-Stammlösung
- e) - 0,01 - 0,40 ml 4-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-oxo-3-butensäure-Stammlösung: 0,03/ 0,3/ 3,0 mg pro 0,5 ml Methanol + 2,5 ml
Phosphat-Puffer
 - 0,005/ 0,02/ 0,05/ 0,10 ml NADPH-Stammlösung.

Ansätze mit verschiedenen Inhibitoren (vgl. Tabellen 12 - 14)

In allen Hemmreihen waren die Variation der Vergleichssubstrat- und Coenzymkonzentration gleich:

- 0,015 (0,02) - 0,12 ml 4-NBA-Stammlösung/2,95 mg/0,5 ml Methanol + 4,5 ml Phosphat-Puffer
- 0,05 ml der NADPH-Stammlösung (5,18 mg/3 ml Tris-Puffer).

Es sind dies auch die Ansätze der ungehemmten Vergleichsreihen, die parallel zu den Hemmreihen gemessen wurden.

Die Inhibitoransätze waren:

- a) 0,005/0,01/0,05/0,15/0,20/0,30 ml 2,4-Dihydroxybenzaldehyd-Stammlösung: 2,95 mg/ 0,5 ml Methanol + 29,5 ml Phosphat-Puffer
- b) 0,005/ 0,01/ 0,025/ 0,05/ 0,1/ 0,15/ 0,2 ml 3,4-Dihydroxybenzaldehyd-Stammlösung: 2,95 mg/0,5 ml Methanol + 29,5 ml Phosphat-Puffer
- c) 0,01/ 0,03/ 0,04/ 0,05/ 0,07/ 0,10/ 0,15 ml 4-(3,4-Dimethoxyphenyl)-4-oxo-buttersäure-Stammlösung: 3,7 mg/0,5 ml Methanol + 4,5 ml Phosphat-Puffer.

Auf Hemmungsversuche gegenüber dem Coenzym NADPH wurde verzichtet.

Die den Ansätzen zugehörigen Konzentrationen sind den bezeichneten Tabellen des Anhangs zu entnehmen.

Meßansätze, die eine Substrathemmung ergaben und diejenigen, deren Umsatzgeschwindigkeiten an der Grenze der Auswertbarkeit lagen, sind nicht aufgeführt.

7. Theoretische Grundlagen der enzymkinetischen Reaktion

Die Michaelis-Konstante eines Enzym-Substratkomplexes, k_m , gilt nach Michaelis und Menten (46) als Maß für die Affinität zwischen Substrat und Enzym unter der Voraussetzung, daß das Enzym (E) reversibel mit dem Substrat (S) reagiert und dabei einen Enzym-Substrat-Komplex (ES) bildet, der irreversibel in freies Enzym und Spaltprodukte (P) zerfällt. k_{1-3} sind die Geschwindigkeitskonstanten der Einzelschritte:



Ist die Geschwindigkeit der Zerfallsreaktion wesentlich geringer als die Bildung des ES-Komplexes ($k_1, k_2 \gg k_3$), so ist sie der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamtreaktion und proportional der ES-Konzentration ($v = k_3 \cdot ES \hat{=} v_{\max}$, wenn $[S] \rightarrow \infty$). k_3 kann dann bei der Anwendung des Massenwirkungsgesetzes vernachlässigt werden:

$$\frac{k_2 + k_3}{k_1} = \frac{(E) \cdot (S)}{(ES)} = \frac{k_2}{k_1} = k_m$$

Der k_m -Wert wird in molar angegeben und besitzt den Wert derjenigen Substratkonzentration, bei der die Hälfte des Enzyms mit Substrat gesättigt ist ($[E] = [ES]$), und bei der die Reaktion mit halbmaximaler Geschwindigkeit abläuft ($v = \frac{1}{2} v_{\max}$), wie folgende Gleichung zeigt:

$$k_m = S \left(\frac{v_{\max}}{v} - 1 \right).$$

Ein hoher k_m -Wert bedeutet also geringe Affinität des Enzyms zu dem jeweiligen Substrat, denn es muß eine hohe Substratkonzentration eingesetzt werden, um Halbsättigung des Enzyms mit Substrat zu erreichen.

Bei komplexeren Zwei-Substrat-Reaktionen, wie der Aldehyd-Reduktase-Reaktion, kann die Michaelis-Konstante als Zusammenfassung mehrerer Einzelkonstanten aufgefaßt werden.

Lineweaver und Burk haben den reziproken Wert der nach v umgeformten Gleichung vorgeschlagen (41):

$$\frac{1}{v} = \frac{k_m}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{v_{\max}}$$

Somit können $v_{\max}$ und k_m direkt aus den Meßwerten der eingesetzten Substratkonzentration (S) und der resultierenden Gesamtreaktionsgeschwindigkeit v ermittelt werden.

Beim Auftragen $\frac{1}{v}$ gegen $\frac{1}{S}$ ergibt sich eine Gerade, die die Abszisse im Punkte $-1/k_m$ und die Ordinate im Punkte $1/v_{\max}$ schneidet.

Die Umrechnung auf 1 mg Protein ist aufgrund der linearen Abhängigkeit der Enzymaktivitäten von der eingesetzten Proteinmenge möglich. Die Streuung der Meßpunkte wurde ausgeglichen durch die Ermittlung einer Regressionsgeraden mit Angabe des Ordinatenabschnittes und Steigungsmaßes $k_m/v_{\max}$. Der Korrelationskoeffizient war bei allen Geraden größer als 0,9. Einzelne, außerhalb der zu erwartenden Streuung liegende Meßpunkte blieben unberücksichtigt.

Diese Berechnung fand auch für die folgenden Auswertverfahren Anwendung.

8. Bestimmung des Hemmtyps (a), der IC_{50} zur Prüfung auf Substrathemmung (b) und der Hemmkonstanten k_i (c)
(vgl. Abb. 25 - 27)

a) Bestimmung des Hemmtyps (40)

Zur Beurteilung der Art der Hemmung durch einen Inhibitor wurden die Lineweaver-Burk-Diagramme herangezogen. Der Verlauf der Geraden zueinander läßt den Hemmtyp erkennen.

Die kompetitive Hemmung

Der Inhibitor reagiert aufgrund struktureller Verwandtschaft reversibel mit dem Enzym an derselben Stelle, mit der das Substrat eine Bindung eingeht. Die Hemmung kann durch Erhöhung der Substratkonzentration zurückgedrängt bzw. aufgehoben werden. Daher scheint die Michaelis-Konstante des Substrates erhöht, während die maximale Reaktionsgeschwindigkeit unbeeinflusst bleibt. Im Lineweaver-Burk-Diagramm schneiden sich die Geraden auf der Ordinate in $1/v_{max}$. Dieser Hemmtyp wurde bei keinem der Versuche beobachtet.

Die nichtkompetitive Hemmung

Der Inhibitor beeinflusst den Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes, nicht aber die Bindung des Substrates an das aktive Zentrum des Enzyms, indem er mit einem von diesem verschiedenen Bindungsort reagiert. Der Grad der Hemmung hängt nicht von $[S]$, sondern von der Inhibitorkonzentration $[I]$ und der Dissoziationskonstanten k_i ab. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ist verringert, der k_m -Wert bleibt unbeeinflusst. Im Lineweaver-Burk-Diagramm schneiden sich die Geraden auf der Abszisse in $-1/k_m$. Das Verhältnis der Ordinatenabschnitte stellt ein Maß für die Enzymmenge dar, die durch den Hemmstoff inaktiviert worden ist.

Der reine nicht-kompetitive Hemmtyp kommt nur selten vor. In der Regel kann ein Inhibitor zwar den Zerfall des ES-Komplexes beeinträchtigen, nicht jedoch gleichzeitig die Bindung des Substrates.

Die unkompetitive Hemmung

Der Inhibitor erhöht scheinbar die Affinität des Enzyms zum Substrat, woraus bei unbeeinflusstem Zerfall des ES-Komplexes eine Aktivierung resultiert. Ist die Zerfallsgeschwindigkeit des Enzym-Inhibitor-Substrat-Komplexes jedoch gleichzeitig verringert, dann führt eine vermehrte Bindung des Substrates zu einer Hemmung. Folgerichtig ist der k_m -Wert ebenso verringert wie die maximale Reaktionsgeschwindigkeit. Die Geraden im Lineweaver-Burk-Diagramm sind daher Parallelen.

Die Überschuß- oder Substrathemmung

In hohen Konzentrationen wirkt das Substrat als Inhibitor, wobei der Mechanismus kompetitiv, nicht-kompetitiv oder gemischt sein kann. Im Lineweaver-Burk-Diagramm nehmen bei Erreichen kleiner $1/S$ -Werte die $1/v$ -Werte wieder zu, die Gerade wird zur Kurve (vgl. Abb. 16 B). Dieser Effekt wurde bei den Untersuchungen dieser Arbeit in jeder Meßreihe beobachtet, jedoch in der graphischen Auftragung aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht berücksichtigt.

b) Bestimmung der halbmaximalen Reaktionshemmung (IC_{50}) zur Prüfung auf Substrathemmung

Nach der von Michaelis und Menten (46) formulierten Enzymkinetik in Gegenwart eines Hemmstoffes ist diejenige Konzentration des Inhibitors, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird, der Dissoziationskonstanten des Enzym-Inhibitorkomplexes, d. h. der Hemmkonstanten k_i , gleich. Bei dieser Konzentration (IC_{50}) ist das Enzym zur Hälfte mit der inhibitorischen Verbindung gesättigt und damit der Cosubstratumsatz um 50 % verringert. Eine einfache Ermittlung der IC_{50} wurde bei allen Substanzen durchgeführt, die nicht als Inhibitoren eingesetzt wurden ("Nichtinhibitoren") und in Vorversuchen keine Hemmung der Standardreaktion bei einer Konzentration von $10 \mu M$ aufwiesen (vgl. Abb. 7).

Für Testsubstanzen, die die Standardreaktion im Bereich dieser Konzentration hemmten, wurde der k_i -Wert und der Hemmtyp nach der im

folgenden Abschnitt beschriebenen Methode nach Dixon bzw. Hunter und Downs bestimmt. Auf die Bestimmung der 50 %-Hemmung wurde dann verzichtet.

Durchführung:

Der Standardreaktion (vgl. Abschn. B.6.) wurde eine zunehmende Menge Inhibitor ad 3 ml Phosphat-Puffer in der Meßküvette zugefügt. Mit 4-NBA wurde die Reaktion gestartet. Die Hemmstoffkonzentrationen lagen im Bereich von 10^{-7} bis 10^{-3} molar (vgl. Tab. 4). Die Einzelheiten der Ansätze der Stammlösungen und die Konzentrationen der Reaktionspartner sind dem Abschn. B.6. und den Abb. 22 - 24 zu entnehmen.

Die ΔE_{340} -Werte in der gehemmten Reaktion wurden in Prozent der ungehemmten Reaktion ($\approx 100\% \Delta E_{340}$) ausgedrückt (vgl. Tab. 4). Graphisch wurde der Grad der Hemmung bzw. die prozentual verbliebene Aktivität gegenüber der Standardreaktion mit 4-NBA gegen den Logarithmus der Inhibitorkonzentration aufgetragen. Aus der resultierenden sigmoiden Kurve wurde die Inhibitorkonzentration bei halbmaximaler Hemmung der Reaktion abgelesen.

c) Bestimmung der Hemmkonstante k_i

Die Hemmkonstante k_i wurde durch zwei Verfahren bestimmt, die auch Aufschluß über den Hemmtyp geben:

die Methode nach DIXON (19) wurde angewandt zur Auswertung von Versuchsreihen, in denen die Inhibitorkonzentration gegenüber einer konstanten Substratkonzentration variiert wurde. Durch die Auftragung des reziproken Wertes der Reaktionsgeschwindigkeit in Gegenwart des Inhibitors ($1/v_i$) gegen die Inhibitorkonzentration $[I]$ resultieren parallele Geraden im Falle des unkompetitiven Hemmtyps und konvergierende Geraden, die sich auf der Abszisse in $-1/k_i$ schneiden: nicht-kompetitiver Hemmtyp.

Da sich dieses Verfahren nicht zur Festlegung eines k_i -Wertes für den unkompetitiven Hemmtyp anwenden ließ, wurde für diesen Fall die

Methode nach HUNTER und DOWNS (34) herangezogen.

Es werden dabei die Versuche mit variiertem Substrat- und konstanter Inhibitorkonzentration betrachtet: Im Diagramm

$$[I] \cdot \frac{v_i}{v - v_i} \quad \text{gegen} \quad [S] \quad \text{ergibt sich bei der nichtkompetitiven}$$

Hemmung eine Parallele zur Abszisse im Abstande von k_i , bei einer unkompetitiven Hemmung eine Hyperbel. Der k_i -Wert kann im zunehmenden Substratkonzentrationsbereich aus dem Abstand der erreichten Parallele zur Abszisse ermittelt werden.

Tab. 3 zeigt in einem Beispiel die Daten zur Festlegung der Koordinatenpunkte in den genannten Diagrammen, wobei von den absoluten Werten für die Reaktionsgeschwindigkeit v ausgegangen wurde.

9. Statistische Auswertung

- a) Die Darstellung der Meßergebnisse erfolgte durch den Mittelwert $\bar{x}$ und die Standardabweichung s der Einzelwerte x (N = Anzahl der Einzelwerte).

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{N}$$

$$s = \sqrt{\frac{SAQ}{N-1}}$$

$$SAQ = \sum (x - \bar{x})^2$$

- b) Die Berechnung der Regressionsgeraden aus den Wertepaaren (x_i/y_i) wurde nach folgender Formel durchgeführt:

$$\text{Steigung } b_x = \frac{S_{xy}}{SAQ_x}$$

mit

$$S_{xy} = \sum x_i \cdot y_i - \frac{\sum x_i \cdot \sum y_i}{N}$$

Achsenabschnitt $a_x = \bar{y} - b_x \cdot \bar{x}$

Korrelationskoeffizient

$$r_{xy} = \frac{S_{xy}}{\sqrt{SAQ_x \cdot SAQ_y}}$$

Die Berechnungen erfolgten durch den Tischcomputer "Monroe Modell 1860".

C. ERGEBNISSE

1. Die spezifische Aktivität der AR in den verwendeten Enzymchargen

Die spezifische Aktivität der teilgereinigten AR wird definiert als die NADPH-Menge, die durch ein mg Protein Enzympräparation pro Minute bei 25°C umgesetzt wird.

Da die Reaktionsgeschwindigkeit der Aldehyd-Reduktase-Reaktion in einer Meßreihe, die nur den Proteingehalt variiert (0,1 - 2 mg), die Konzentration des Substrates (4-NBA) und des Coenzym (NADPH) aber konstant läßt, linear ansteigt, ist die Umrechnung und der Bezug des gemessenen absoluten v-Wertes der Testreaktion auf 1 mg Protein statthaft (vgl. Abb. 8). Die Linearität der NADPH-Oxidation gilt auch für die übrigen als Substrate eingesetzten Verbindungen (vgl. Abb. 13, 17, 19).

Die spezifischen Aktivitäten der einzelnen Präparationen sind mit 4,35 bis 6,0 nMol/min · mg Protein nahezu gleich (vgl. Tab. 2).

Der absolute NADPH-Umsatz in der Standardreaktion beträgt: $4,7 \pm 0,25$ nMol/min. Die mit den verschiedenen Enzymchargen durchgeführten kinetischen Studien sind daher direkt vergleichbar.

2. Der Mechanismus der Aldehyd-Reduktase-Reaktion

Enzymatische Reaktionen (43), bei denen gleichzeitig zwei Substrate, wie im vorliegenden Fall 4-NBA und NADPH, umgesetzt werden, können verschiedene Reaktionsmechanismen aufweisen, die nach DALZIEL (15) graphisch analysiert werden können.

Die kinetischen Daten dieser 2-Substrat-Reaktionen werden für die Hin-Reaktion durch folgende Gleichung beschrieben:

$$\frac{[E]_0}{v_0} = \phi_0 + \frac{\phi_1}{S_1} + \frac{\phi_2}{S_2} + \frac{\phi_{12}}{S_1 S_2}$$

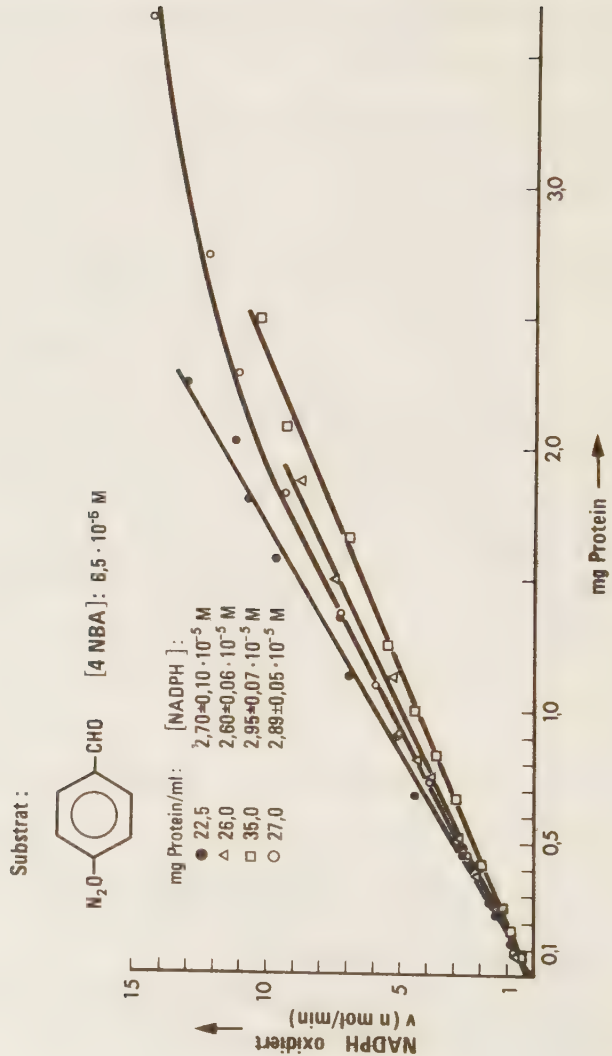


Abb. 8 : Die NADPH - Oxidation durch die Aldehyd - Reduktase in Abhängigkeit von der eingesetzten Enzymproteinkonzentration (4 Proteinchargen)
Substrat : 4 - Nitrobenzaldehyd

worin $[E]_0$ die eingesetzte Enzymmenge und $[S_1$ bzw. $S_2]$ die Konzentrationen der umgesetzten Substrate bedeuten ($S_1 = \text{NADPH}$ / $S_2 = 4\text{-NBA}$). v_0 stellt die resultierende Umsatzgeschwindigkeit dar. Die 4 Koeffizienten ($\phi_0 / \phi_1 / \phi_2 / \phi_{12}$) lassen sich graphisch aus Sekundärdiagrammen (Abb. 9 A/B) bestimmen, die auf Lineweaver-Burk-Diagrammen (Abb. 11/12) beruhen: dabei werden einmal die Steigungen der Primärgeraden, zum anderen die entsprechenden Ordinatenabschnitte gegen die zugehörigen Reziprokwerte der jeweils eingesetzten (Co-)Substratkonzentration aufgetragen (vgl. Tab. 5.6).

Da die Enzympräparation nur teilgereinigt ist, werden die Koeffizienten auf "mg Protein" bezogen.

Die Ordinatenabschnitte der Sekundärphänomene ergeben folgende Werte für:

$$\phi_0 = 8,25 \cdot 10^{-2} \text{ (n Mol/min} \cdot \text{mg Protein)}^{-1}$$

$$\phi_1 = 3,6 \cdot 10^{-3} \text{ (n Mol/min} \cdot \text{mg Protein)}^{-1} \text{ (mM)}$$

$$\phi_2 = 0,2 \cdot 10^{-3} \text{ (n Mol/min} \cdot \text{mg Protein)}^{-1} \text{ (mM)}$$

ϕ_{12} entspricht der Steigung der Parallelen in Abb. 9 B und beträgt:

$$\phi_{12} = 9,23 \cdot 10^{-6} \text{ (n Mol/min} \cdot \text{mg Protein)}^{-1} \text{ (mM)}^2$$

Das Verhältnis der 4 Koeffizienten zueinander läßt Aussagen über den Reaktionstyp zu.

Im vorliegenden Fall kommt

$$\frac{\phi_1 \cdot \phi_2}{\phi_{12}} = 7,8 \cdot 10^{-2} \text{ (n Mol/min} \cdot \text{mg Protein)}^{-1}$$

dem Koeffizienten $\phi_0 = 8,25 \cdot 10^{-2} \text{ (n Mol/min} \cdot \text{mg Protein)}^{-1}$ gleich, was dem Typ I b der von Dalziel untersuchten Reaktionsmechanismen entspricht.

Der Typ I b stellt ein Reaktionsgleichgewicht zwischen 4 binären und 2 ternären Enzym-Substrat-Komplexen dar. Binäre Komplexe bestehen aus dem Enzymprotein mit einem aktiven Zentrum und einem addierten Substrat $[ES]$, während im ternären Komplex 2 Substrate an das Enzym mit zwei unabhängigen aktiven Zentren gebunden sind.

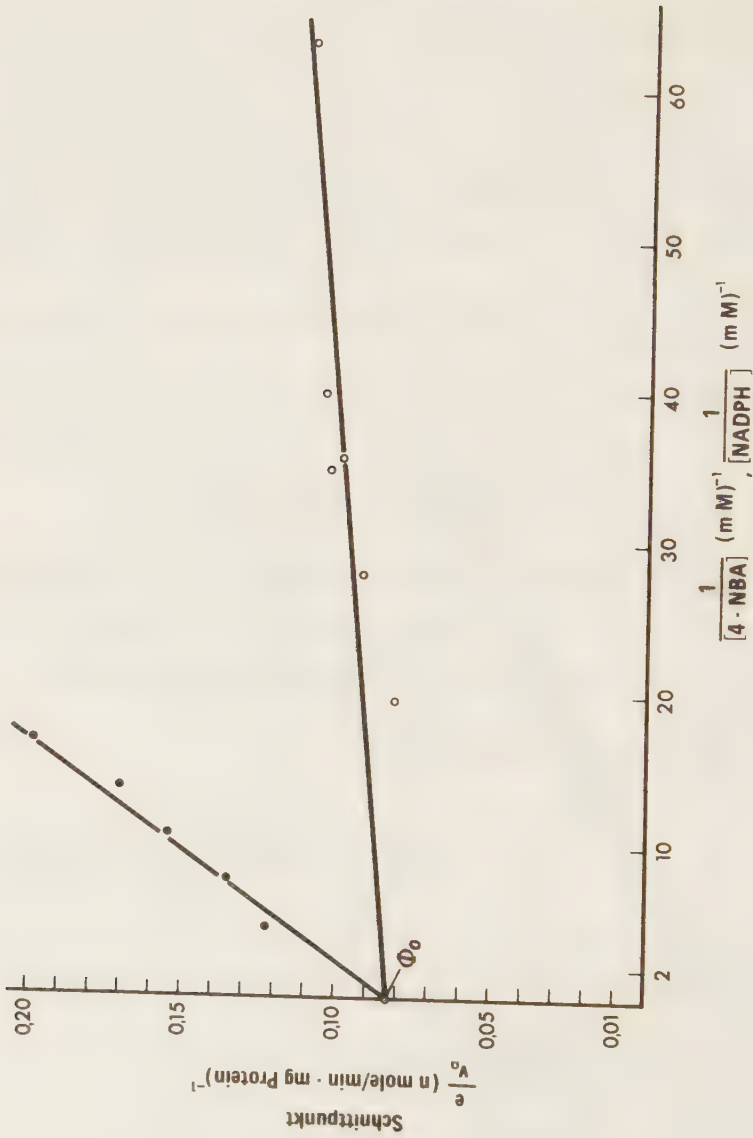


Abb. 9 A : Sekundäres Diagramm der Ordinaten - Schnittpunkte nach DALZIEL

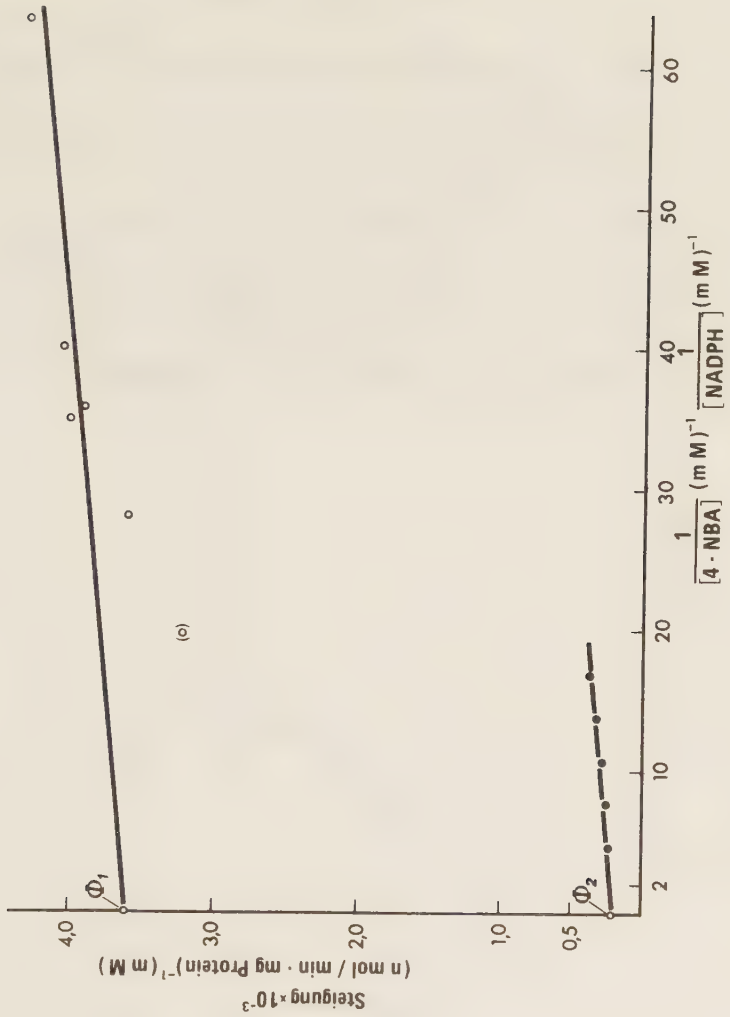
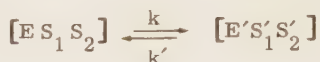


Abb. 9 B : Sekundäres Diagramm der Steigungen nach DALZIEL

Die intramolekulare Reaktion des ternären Enzymkomplexes



ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Darüber hinaus beeinflusst die Bindung des Enzyms an ein Substrat nicht seine Affinität zu einem anderen Substrat. Die Michaelis-Konstante eines Substrates ist unabhängig von der Konzentration des anderen Substrates. Daraus resultiert eine wahllose Addition der Substrate an das Enzym (random order) im Gegensatz zur Reaktionsorganisation in festgelegter Reihenfolge (compulsory order). Diesen Ablauf der Reaktion verdeutlicht Abb. 10, worin k_1 , k'_1 usw. die Dissoziationskonstante der Bildungs- bzw. Zerfallsreaktion des Enzym-Substrat-Komplexes und E die "high k_m "-Aldehyd-Reduktase bedeuten.

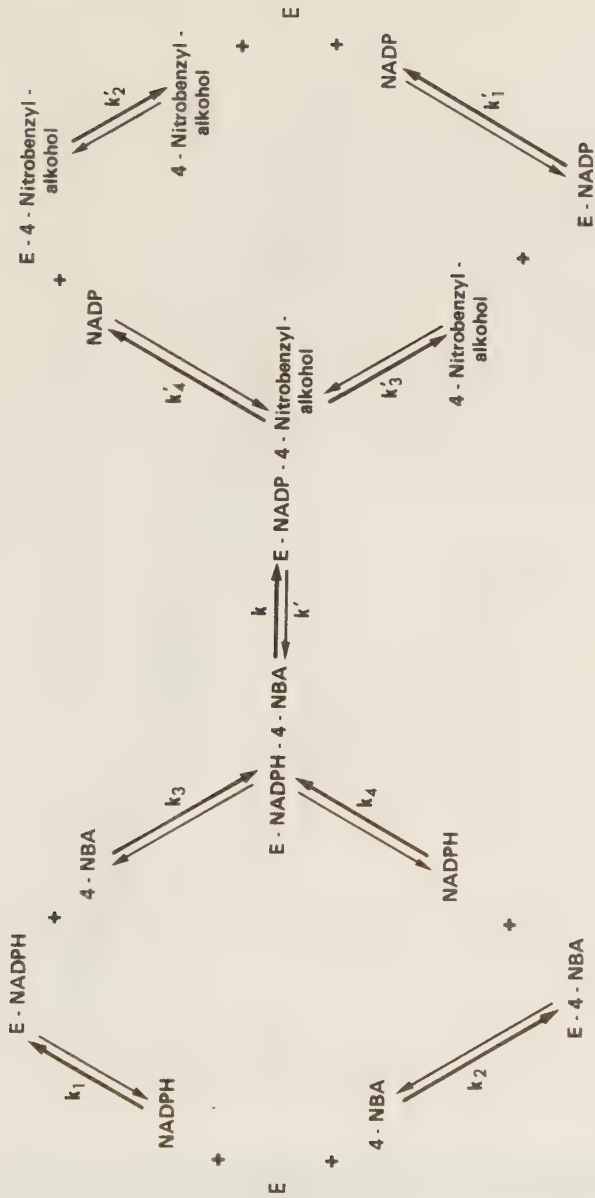


Abb. 10: Die random - order - Addition der AR - Reaktion mit den Substraten 4 - NBA und NADPH

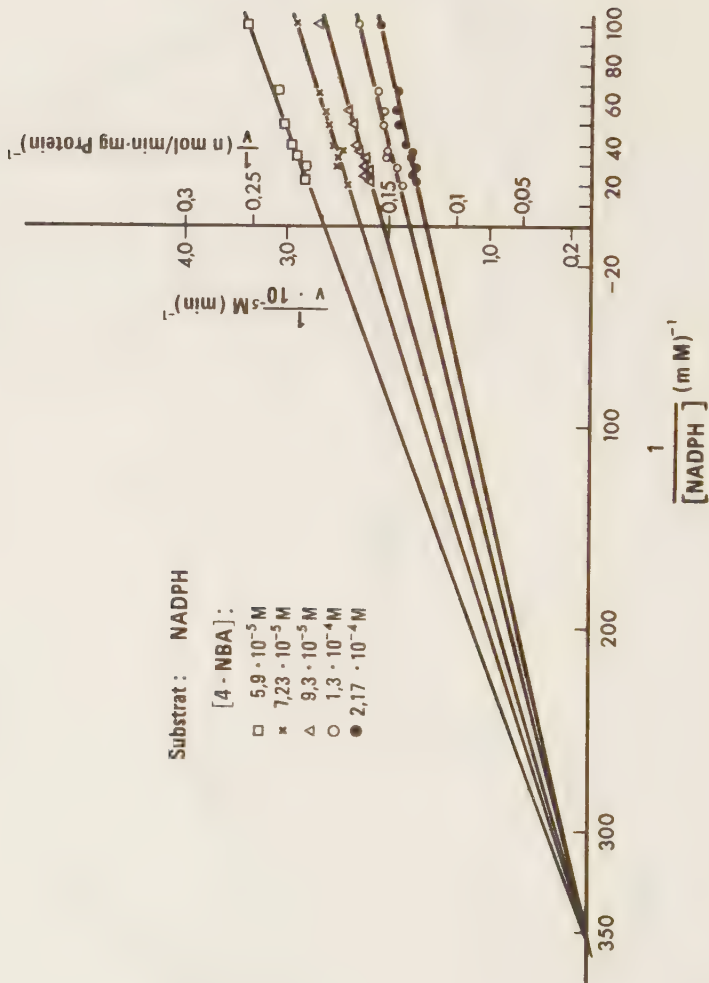


Abb. 11 : Doppelt reziprokes Diagramm der NADPH - Oxidation bei verschiedenen 4 - Nitrobenzaldehyd - Konzentrationen (vgl. Tab. 5)

3. Die Substratspezifität der Rinderhirn-Aldehyd-Reduktase

a) 4-Nitrobenzaldehyd

Als Standardsubstrat der Aldehyd-Reduktase wurde 4-NBA benutzt, und die Affinität des Aldehyds zum Enzym, der NADPH-Umsatz sowie der Reaktionsmechanismus der durch die Aldehyd-Reduktase katalysierten Reaktion untersucht (vgl. Abschn. C. 2.).

Die Konzentrationen der Reaktionspartner, die theoretisch maximale Umsatzgeschwindigkeit für NADPH und die errechneten k_m -Werte für jede Meßreihe sind in den Tabellen 5 und 6 des Anhanges aufgeführt. Werden 4-NBA und NADPH jeweils getrennt als Substrate betrachtet und alle Einzel- k_m -Werte gemittelt, sowie in den Lineweaver-Burk-Diagrammen (Abb. 11 und 12) als Mittelwert von $-1/k_m$ aufgetragen, ergeben sich folgende k_m -Werte:

- NADPH : 2,8 μM	- [S] : 10 - 50 μM
- 4-NBA : 55 μM	- [S] : 26 - 195 μM

Die maximalen Umsatzgeschwindigkeiten betragen:

$$\begin{aligned} &5,0 - 8,1 \text{ nMol/min} \cdot \text{mg Protein} \quad \text{und} \\ &9,0 - 12,2 \text{ nMol/min} \cdot \text{mg Protein} . \end{aligned}$$

Die von TURNER und TIPTON für 4-NBA über einen 2 Zehnerpotenzen umfassenden Konzentrationsbereich von ca. 3 - 300 μM (69) beobachteten 2 Geraden mit unterschiedlichem Winkel zur x-Achse in der doppelt reziproken Darstellung wurden für den in dieser Arbeit benutzten Konzentrationsbereich nicht gefunden. Der Vergleich der Angaben der beiden Autoren ergibt, daß ein Abknicken der Geraden erst in 2 - 3fach kleineren Substratkonzentrationen zu erwarten ist, die gefundenen k_m -Werte also einer "high k_m -Reduktase" zugeordnet werden müssen.

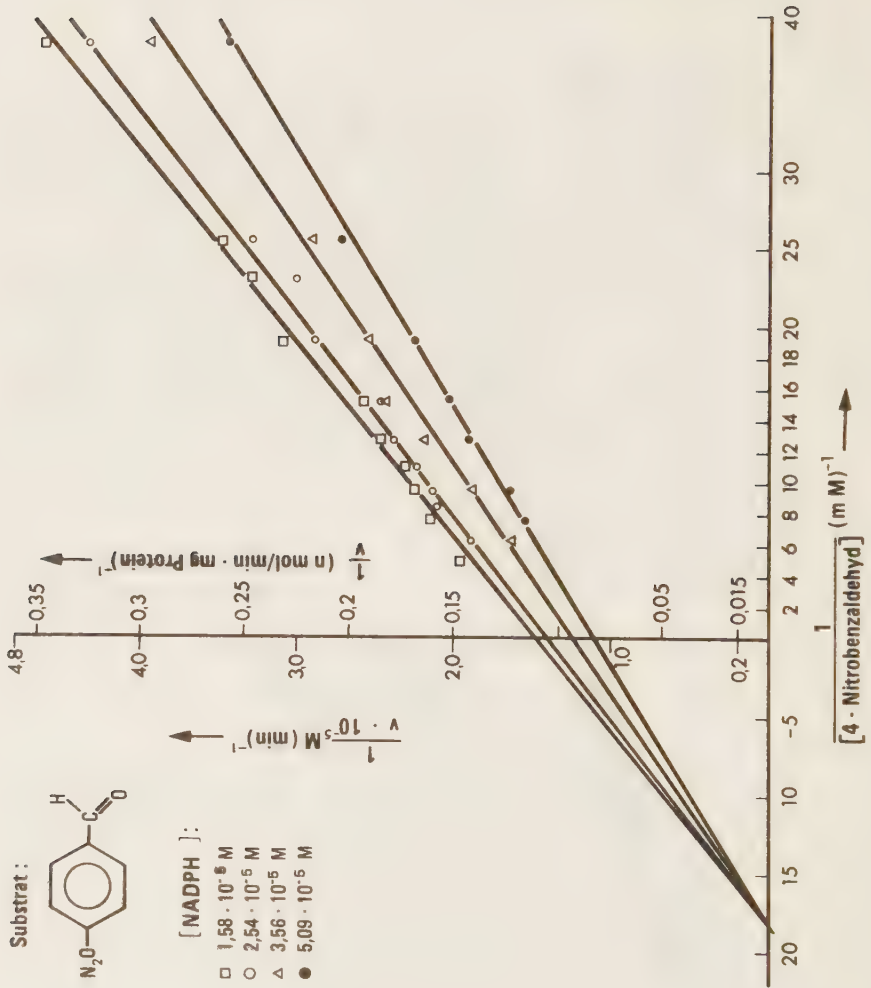


Abb. 12: Doppelt reziprokes Diagramm der 4 - NBA - Reduktion bei verschiedenen NADPH - konzentrationen (vgl. Tab. 6)

b) Dimethoxybenzaldehyde

Die 3 isomeren Dimethoxybenzaldehyde mit den Substituenten am aromatischen Ring in 2, 3 -, 3, 4- und 3, 5-Stellung können von der Aldehyd-Reduktase ebenfalls als Substrate, jedoch mit deutlich geringerer Geschwindigkeit umgesetzt werden. Für die Verbindungen besteht eine lineare Abhängigkeit der NADPH-Oxidation von der Enzymproteinkonzentration (Abb. 13).

In allen Meßreihen ergaben die $1/v$ - $1/S$ -Diagramme (vgl. Tab. 7 - 9 im Anhang und Abb. 14 - 16) zwei Geraden mit unterschiedlichem Winkel zur x-Achse, die in Anlehnung an Turner und Tipton durch Extrapolation der zugehörigen Meßpunkte die Berechnung zweier k_m -Werte (high- und low- k_m) zuließen.

Im Bereich hoher Substratkonzentrationen ergab sich, der high- k_m -Wert für:

- 3, 4-Dimethoxybenzaldehyd:
0,13 mM - [S] : $0,8 - 16,0 \cdot 10^{-4}$ M
- 2, 3-Dimethoxybenzaldehyd:
0,18 mM - [S] : $0,9 - 9,0 \cdot 10^{-4}$ M
- 3, 5-Dimethoxybenzaldehyd:
83 μ M - [S] : $1,0 - 10,0 \cdot 10^{-4}$ M

Die low- k_m -Werte im Bereich kleinerer Substratkonzentrationen sind:

- 3, 4-DMBA
5,9 μ M - [S] : $0,16 - 1,0 \cdot 10^{-4}$ M
- 2, 3-DMBA
21,0 μ M - [S] : $0,3 - 2,0 \cdot 10^{-4}$ M
- 3, 5-DMBA
17,0 μ M - [S] : $0,5 - 2,0 \cdot 10^{-4}$ M.

Der "Umschlagspunkt" in der Affinität des einzelnen Substrates zu einer geringeren Bindungskraft des Enzyms ist, wie die Abbildungen zeigen, in allen Meßreihen weitgehend gleich.

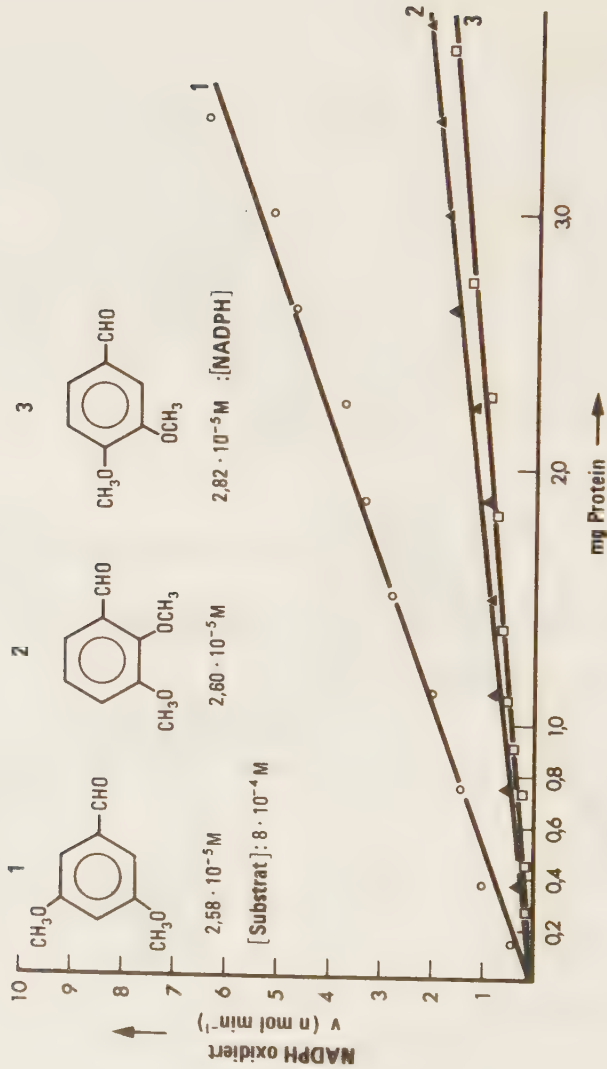


Abb. 13: Die NADPH - Oxidation durch die AR in Abhängigkeit von der eingesetzten Enzymproteinkonzentration.
Substrate : 3 isomere Dimethoxybenzaldehyde

Das Verhältnis der zwei k_m -Werte zueinander wird in der Reihenfolge 3, 4- - 2, 3- - 3, 5-Dimethoxybenzaldehyd kleiner.

Die maximalen Umsatzgeschwindigkeiten für NADPH, die für jede Meßreihe aus den Lineweaver-Burk-Darstellungen, getrennt für eine low- und high- k_m -Reduktase, ermittelt wurden, erhöhen sich in derselben Reihenfolge (in n Mol/min · mg Protein):

	high- k_m -AR	low- k_m -AR
3, 4-DMBA :	0, 6-1, 0	0, 3-0, 5
2, 3-DMBA :	0, 8-1, 6	0, 3-0, 8
3, 5-DMBA :	2, 0-2, 2	1, 2-1, 6.

Es katalysieren also Enzymanteile mit größerer Affinität zum Substrat geringfügig verringerte Cosubstratumsätze.

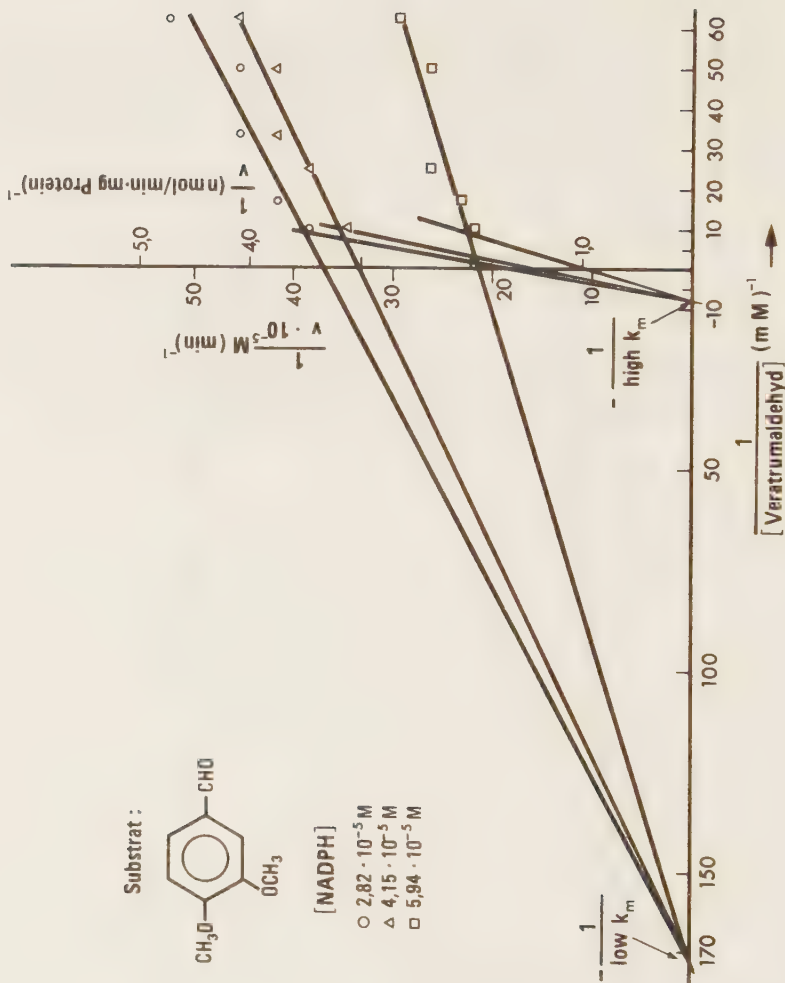


Abb. 14A : Doppelt reziprokes Diagramm der Veratrumaldehyd - Reduktion bei verschiedenen NADPH - Konzentrationen (Gesamtdarstellung) (vgl. Tab. 7)

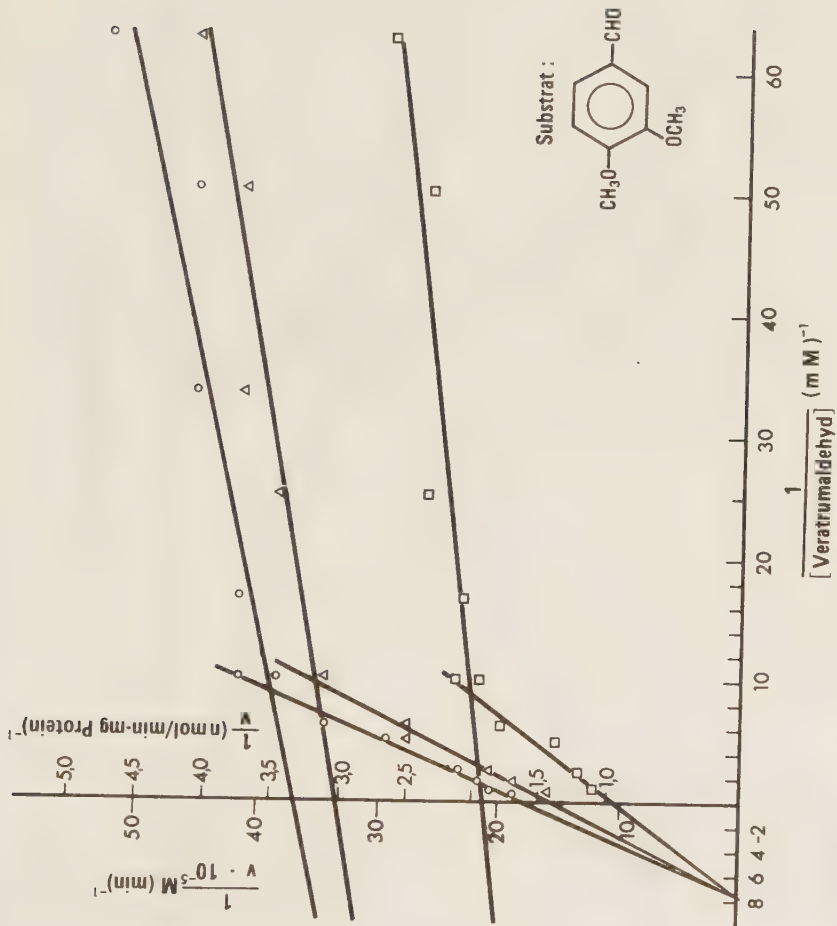


Abb. 14B : Doppelt reziprokes Diagramm der Veratrumaldehyd - Reduktion bei verschiedenen NADPH - Konzentrationen (Teildarstellung der Abb.14A mit Wiedergabe der Meßpunkte im Bereich hoher Substratkonzentrationen)

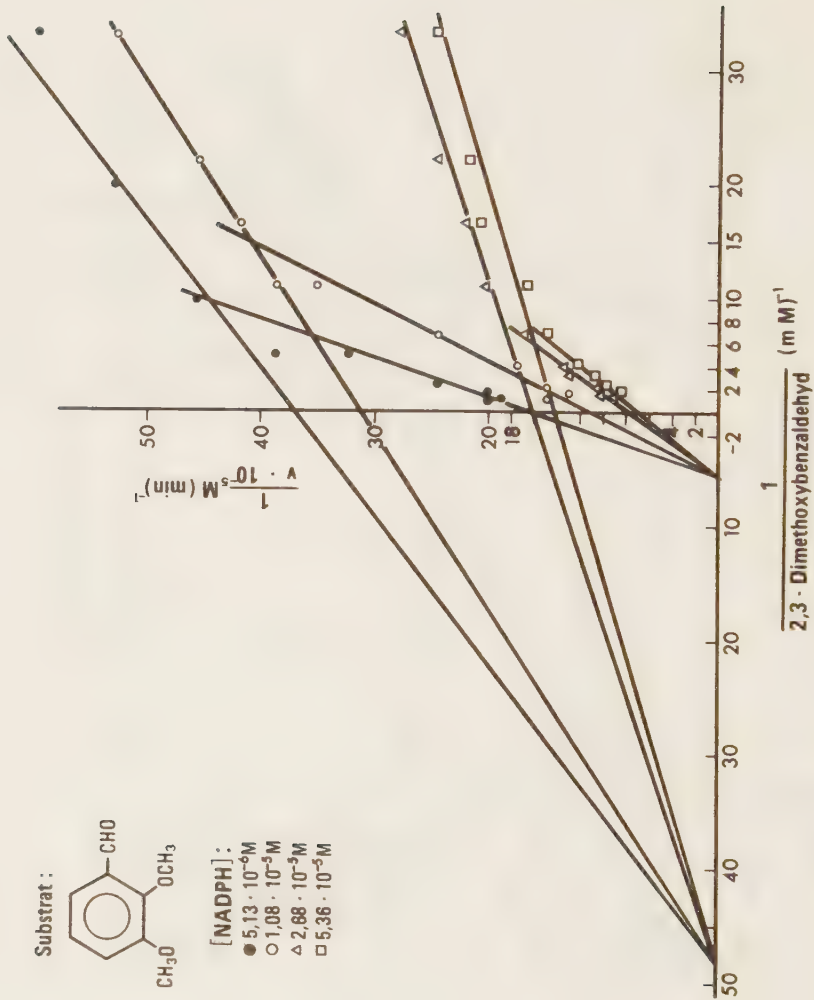


Abb. 15 : Doppelt reziprokes Diagramm der 2,3 - Dimethoxybenzaldehyd - Reduktion bei verschiedenen NADPH -konzentrationen (vgl. Tab. 8)

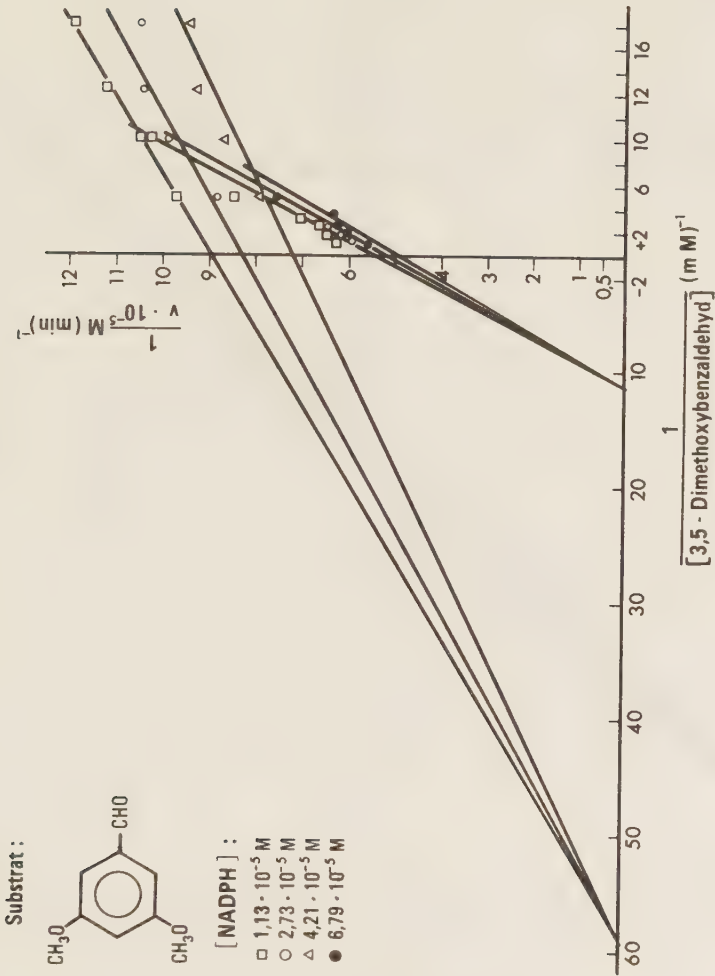


Abb. 16A : Doppelt reziprokes Diagramm der 3,5 - Dimethoxybenzaldehyd - Reduktion bei verschiedenen NADPH - konzentrationen [Gesamtdarstellung (vgl. Tab. 9)]

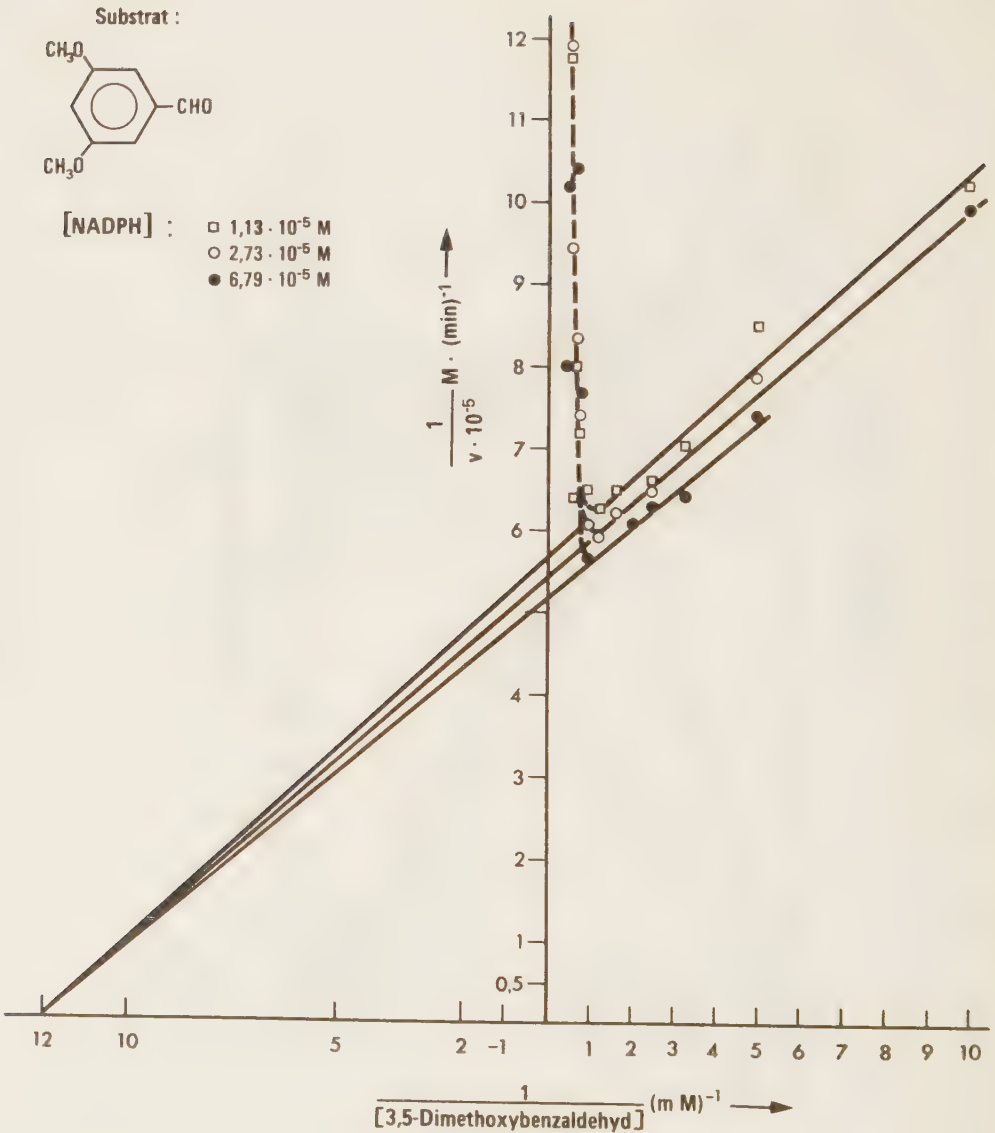


Abb. 16 B : Beispiel einer Substrathemmung im doppelt reziproken Diagramm der 3,5 - Dimethoxybenzaldehyd - Reduktion bei verschiedenen NADPH - konzentrationen (Teildarstellung der Abb. 16 A mit Wiedergabe der Meßpunkte im Bereich hoher Substratkonzentrationen)

c) Trimethoxybenzaldehyde

Orientierende Versuche ließen aus dieser Substanzgruppe nur die Verwendung des 3, 4, 5-Trimethoxybenzaldehyd als sinnvoll erscheinen. Wie bei den Dimethoxybenzaldehyden besteht lineare Abhängigkeit des NADPH-Umsatzes von der Proteinkonzentration (vgl. Abb. 17). Auch lassen sich bei dem gewählten Substratkonzentrationsbereich 2 Geraden konstruieren, die 2 k_m -Werte ergeben (vgl. Tab. 10 und Abb. 18):

- high k_m -Wert : 0,17 mM - $[S] = 3,4 - 17 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
- low k_m -Wert : 52 μM - $[S] = 0,5 - 3,4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

Die theoretisch maximalen Umsatzgeschwindigkeiten für die high- k_m -Reduktase liegen zwischen 0,51 und 0,75 n Mol/min · mg Protein und für die low- k_m -Reduktase zwischen 0,38 bis 0,63 n Mol/min · mg Protein. Somit wird diese Substanz in ähnlich geringer Geschwindigkeit wie 3,4-Dimethoxybenzaldehyd umgesetzt.

Die bei den Dimethoxybenzaldehyden vorhandenen Unterschiede der maximalen Umsatzraten für die Enzymanteile sind bei 3,4,5-Trimethoxybenzaldehyd kaum mehr erkennbar.

Die zwei isomeren Trimethoxybenzaldehyde mit den Methoxygruppen in 2,3,4- und 2,4,5-Stellung am aromatischen Ringsystem reagieren unter den gewählten Bedingungen mit dem Ferment nicht.

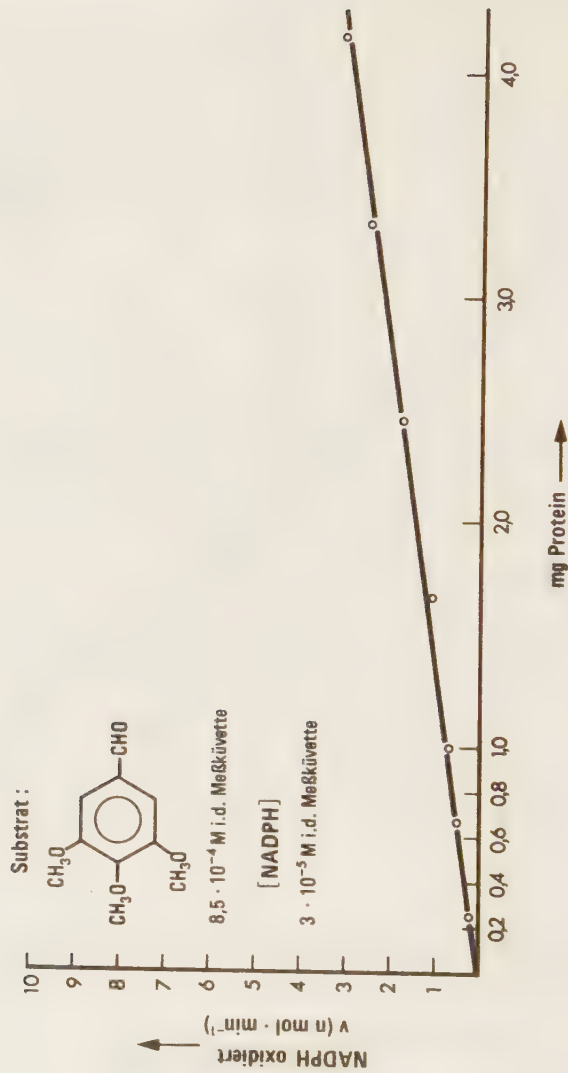


Abb. 17 : NADPH - Oxidation durch die AR in Abhängigkeit von der Enzym-
proteinkonzentration.
Substrat : 3, 4, 5 - Trimethoxybenzaldehyd

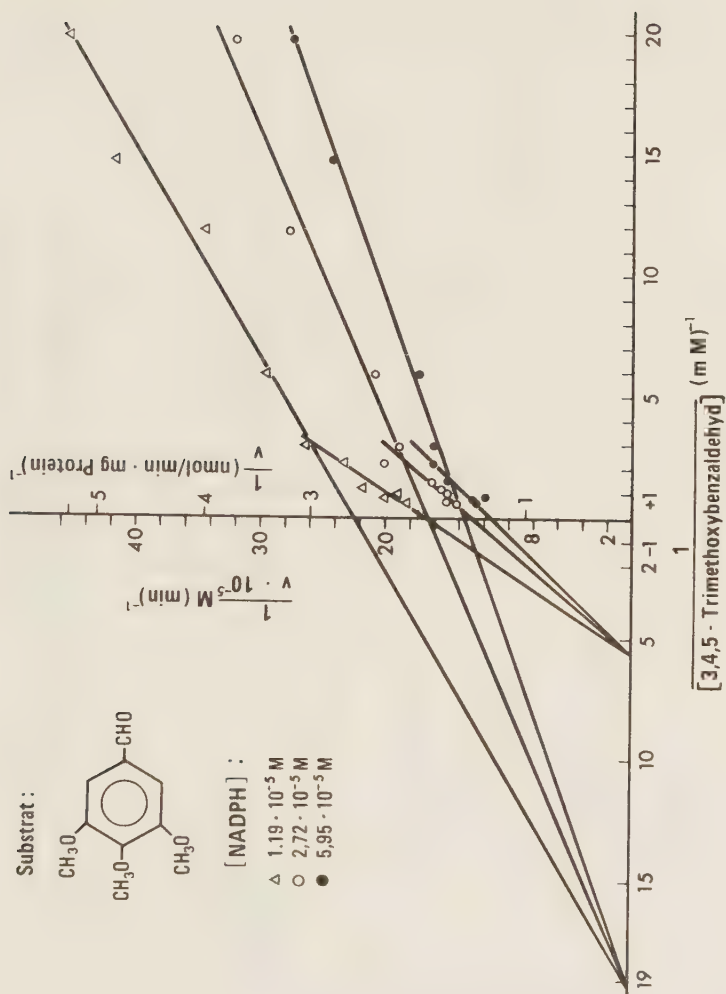


Abb. 18 : Doppelt reziprokes Diagramm der 3, 4, 5 - Trimethoxybenzaldehyd-Reduktion bei verschiedenen NADPH - Konzentrationen (vgl. Tab. 10)

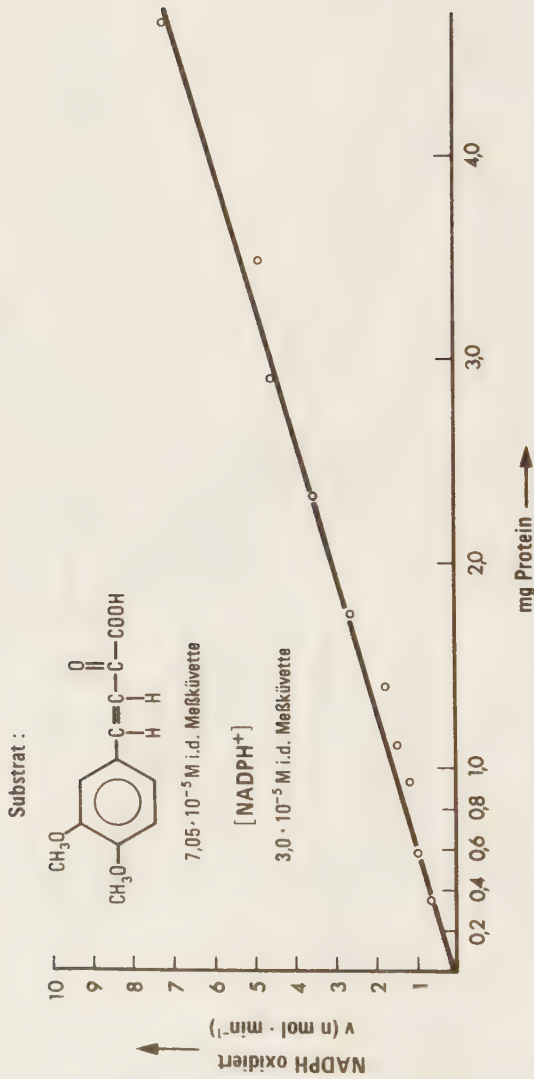
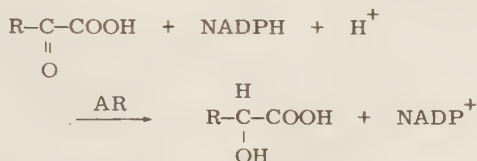


Abb. 19: Die NADPH -Oxydation durch die AR in Abhängigkeit von der eingesetzten Enzymproteinkonzentration
Substrat : 4 - (3, 4 - Dimethoxyphenyl) - 2 - oxo - 3 - butensäure

d) 4-(3, 4-Dimethoxyphenyl)-2-oxo-3-butensäure

Diese Substanz wurde eingesetzt, um die Reduzierung einer Verbindung mit einer Ketogruppe durch die AR nach der allgemeinen Reaktionsformulierung:



zu testen. Durch die zwei Methoxygruppen am aromatischen Ring besteht eine chemische Verwandtschaft zu den Dimethoxybenzaldehyden.

Die NADPH-Oxidation in Gegenwart dieser Substrate verläuft wiederum linear zur Enzymkonzentration (vgl. Abb. 19).

4-(3, 4-Dimethoxyphenyl)-2-oxo-3-butensäure wird in dem Konzentrationsbereich von 0,1 - 28,2 μM durch eine high- und low- k_m -Reduktase reduziert (vgl. Abb. 20 A/B).

Die berechneten k_m -Werte sind (vgl. Tab. 11):

- high- k_m : 0,64 μM - [S] : 0,2 - 28,2 μM
- low- k_m : 93 nM - [S] : 0,1 - 0,7 μM .

Danach hat 4-(3, 4-Dimethoxyphenyl)-2-oxo-3-butensäure im Vergleich zu den untersuchten Di- und Trimethoxybenzaldehyden, deren k_m -Werte im Bereich von 10^{-6} bis 10^{-4} M liegen, eine höhere Affinität zur AR.

Die maximalen Reaktionsumsätze (1,4 - 1,7 nMol/min · mg Protein für high- k_m -AR und 0,6 - 0,8 nMol/min · mg Protein für low- k_m -AR) liegen jedoch in derselben Größenordnung, die für die am aromatischen Ring substituentengleichen Dimethoxybenzaldehyde ermittelt wurde (vgl. Tab. 7 - 9 des Anhanges). Tabelle A faßt die Ergebnisse zur Aldehyd-Substratprüfung zusammen.

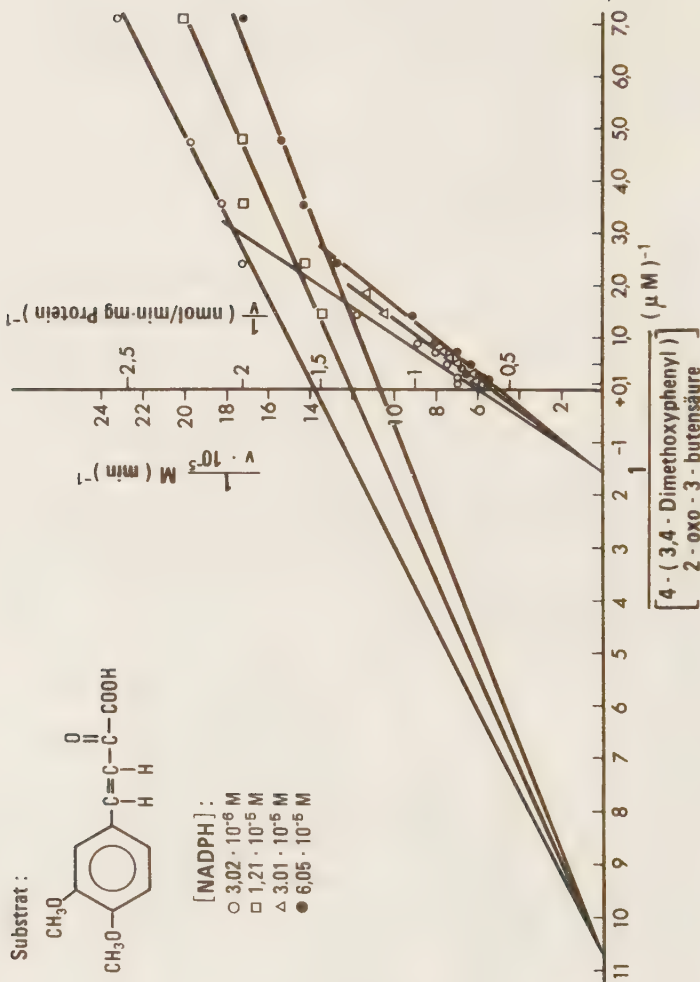


Abb. 20 A : Doppelt reziprokes Diagramm der Reduktion des Substrates 4 - (3, 4 - Dimethoxyphenyl) - 2 - oxo - 3 - butensäure bei verschiedenen NADPH - konzentrationen (Gesamtdarstellung) (vgl. Tab. 11)

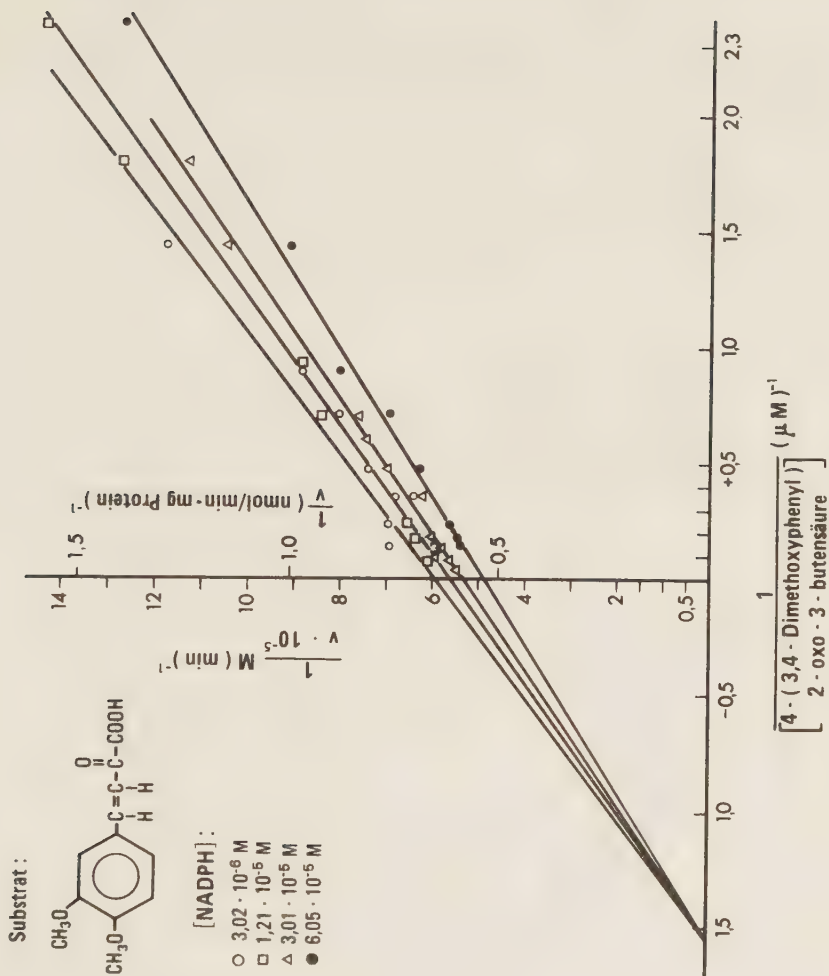


Abb. 20 B : Teildarstellung der Abb. 20 A mit Wiedergabe aller Meßpunkte im Bereich hoher Substratkonzentrationen (vgl. Tab. 11 !)

Tabelle A Zusammenfassung der Ergebnisse zur Aldehyd-Substratprüfung

Substrate	k_m -Wert ($\pm$ S. D.) ermittelt aus den Lineweaver-Burk-Diagrammen und Tab. 5 - 11		maximale Reaktionsgeschwindigkeit $v_{\max}$ (n Mol./min. mg Prot.) bei $[NADPH] : 2,8 \cdot 10^{-5} M$	% des NADPH-Umsatzes mit dem Vergleichssubstrat 4-NBA	halbmaximale Reaktionshemmung der Standardreaktion bei folgender Hemmkonzentration (IC_{50}) :
NADPH	-	$2,8 \pm 0,1 \cdot 10^{-6} M$	-	-	-
4-NBA	-	$5,5 \pm 0,15 \cdot 10^{-5} M$	9,62	100 %	-
3,4-Dimethoxybenzaldehyd	$5,9 \pm 0,17 \cdot 10^{-6} M$	$1,3 \pm 0,03 \cdot 10^{-4} M$	0,61	6,4 %	$1,7 \cdot 10^{-3} M$
2,3-Dimethoxybenzaldehyd	$2,1 \pm 0,15 \cdot 10^{-5} M$	$1,8 \pm 0,06 \cdot 10^{-4} M$	1,50	15,6 %	$1,5 \cdot 10^{-3} M$
3,5-Dimethoxybenzaldehyd	$1,7 \pm 0,05 \cdot 10^{-5} M$	$8,3 \pm 0,06 \cdot 10^{-5} M$	2,12	22,0 %	$1,5 \cdot 10^{-3} M$
3,4,5-Trimethoxybenzaldehyd	$5,2 \pm 0,1 \cdot 10^{-5} M$	$1,8 \pm 0,17 \cdot 10^{-4} M$	0,66	6,8 %	$2,0 \cdot 10^{-3} M$
2,3,4-Trimethoxybenzaldehyd	-	-	-	-	$3,2 \cdot 10^{-3} M$
2,4,5-Trimethoxybenzaldehyd	-	-	-	-	$3,1 \cdot 10^{-4} M$
4-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-oxo-3-butensäure	$9,3 \pm 0,4 \cdot 10^{-8} M$	$6,4 \pm 0,12 \cdot 10^{-7} M$	1,59	16,5 %	$1,2 \cdot 10^{-4} M$

e) Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten der AR bei Verwendung der verschiedenen Substrate

Werden die maximalen NADPH-Umsatzgeschwindigkeiten bei Verwendung der Testsubstrate getrennt für die high- k_m - und low- k_m -Reduktase mit derjenigen mit 4-NBA (high- k_m -Reduktase) und untereinander verglichen, so wird deutlich (Abb. 21 und Tab. 5 - 11 und A):

- 1) Bei einer NADPH-Konzentration von $28 \pm 1,7 \mu\text{M}$ liegen die maximalen Reaktionsumsätze für NADPH mit den Testsubstraten zwischen 6,4 % und 22 % des v_{max} -Wertes für 4-NBA ($= 9,6 \text{ nMol/min} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot 100 \%$).

Bei anderen NADPH-Konzentrationen ändert sich dieses prozentuale Verhältnis aufgrund der unterschiedlichen Steigerungsraten der Reaktionsumsätze der Testsubstanzen bzw. von 4-NBA.

Für 4-NBA ist die Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender NADPH-Konzentration ($\Delta v_{\text{max}} / \Delta [\text{NADPH}]$) deutlich größer als bei den Testsubstraten.

Daher verringert sich bei höheren Coenzymkonzentrationen das prozentuale Verhältnis zuungunsten der Testsubstrate bzw. verbessert sich bei geringeren NADPH-Konzentrationen. Die Veränderungen sind jedoch nicht linear, da die Umsatzsteigerungsrate für 4-NBA mit zunehmender Coenzymkonzentration größer wird.

- 2) Im Vergleich untereinander unterscheiden sich die Steigerungsraten der Reaktionsumsätze der Testsubstanzen nur geringfügig. Die größte Umsatzsteigerungsrate - sowohl im high- k_m - als auch im low- k_m -Reduktase-Bereich - wird mit 2,3-Dimethoxybenzaldehyd, die geringste mit 4-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-oxo-3-butensäure erreicht.
- 3) Der Einfluß der Konzentration des NADPH auf die Reaktionsgeschwindigkeit in Anwesenheit der einzelnen Substrate ist verschieden. In den Versuchen mit 4-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-oxo-3-butensäure mußte die Coenzymkonzentration am stärksten (3,0 bis $60 \mu\text{M}$), im Falle des 3,4-DMBA am geringsten ($28 - 59 \mu\text{M}$) variiert werden, um eine vergleichbare Änderung in der Reaktionsgeschwindigkeit zu erzielen.

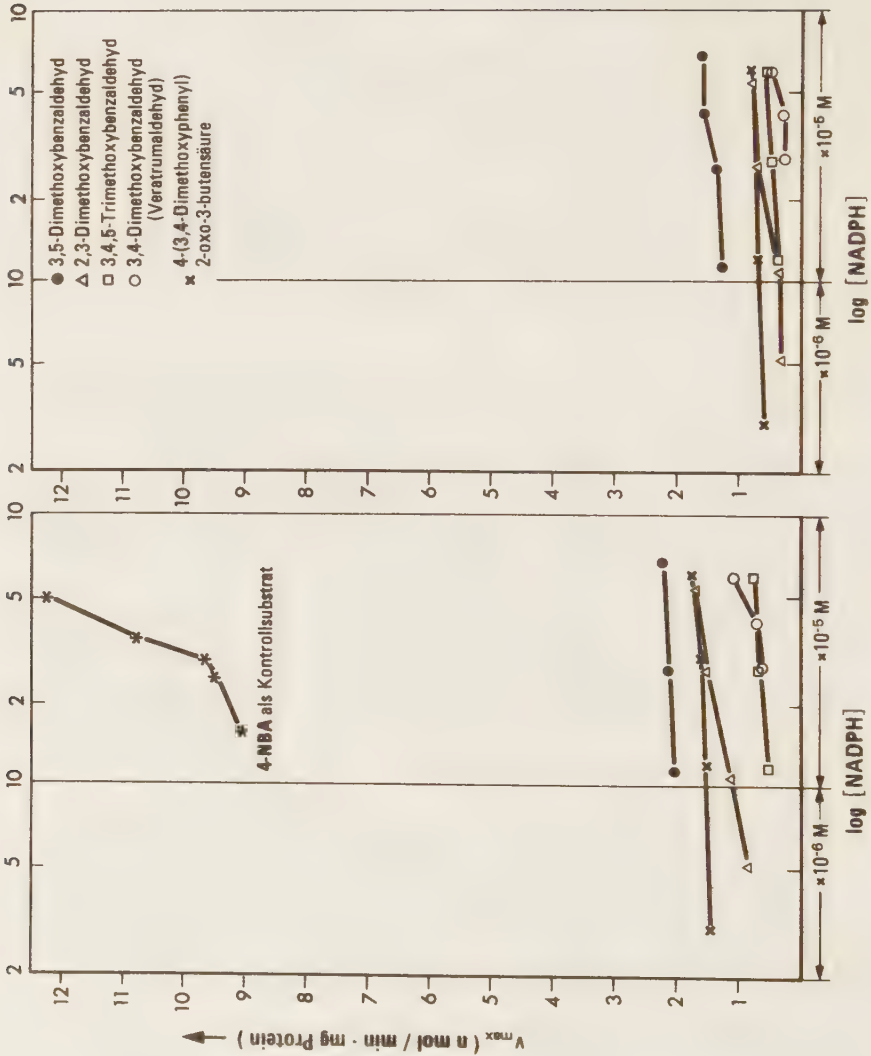


Abb. 21 : Die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der NADPH - konzentration : high - k_m - AR - Aktivität mit Vergleich des Umsatzes gegenüber 4-NBA (linker Bildanteil) Rechts: low - k_m - AR - Aktivität

Weitere Erhöhungen oder Verminderungen der NADPH-Konzentration außerhalb der genannten Bereiche haben keinen beschleunigenden oder hemmenden Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Dadurch wird auch deutlich, daß die verwendeten NADPH-Meßansätze das Reaktions-optimum darstellen.

- 4) Die Abbildung 21 verdeutlicht die für alle Substrate geltende Abnahme der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit unter dem Einfluß desjenigen Enzymanteils, der eine stärkere Affinität zum Substrat aufweist (low- k_m -Reduktase).

4. Hemmung der AR-Reaktion durch "Nichtinhibitoren"
(vgl. Tab. A und Abb. 22 - 24)

Wurden die bisher besprochenen Substanzen in die Standardreaktion in Konzentrationen von 10^{-4} M und höher eingesetzt, so wirken sie wie Inhibitoren. Abb. 22 - 24 zeigen den sigmoiden Kurvenverlauf der %-Hemmung - $\log [I]$ -Diagramme. Die IC_{50} -Werte sind für alle Dimethoxybenzaldehyde $1,5$ bzw. $1,7 \cdot 10^{-3}$ molar und für zwei isomere Trimethoxybenzaldehyde $2,0$ bzw. $3,2 \cdot 10^{-3}$ molar. Bemerkenswerterweise liegt die 50 %-Hemmung durch 2,4,5-Trimethoxybenzaldehyd und durch die 4-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-oxo-3-butensäure mit $3,1 \cdot 10^{-4}$ bzw. $1,2 \cdot 10^{-4}$ M eine Zehnerpotenz niedriger. Diese Substanzen sind schwache Hemmstoffe, die erstgenannte Verbindung markiert offenbar einen Übergang vom Substrat zum Inhibitor.

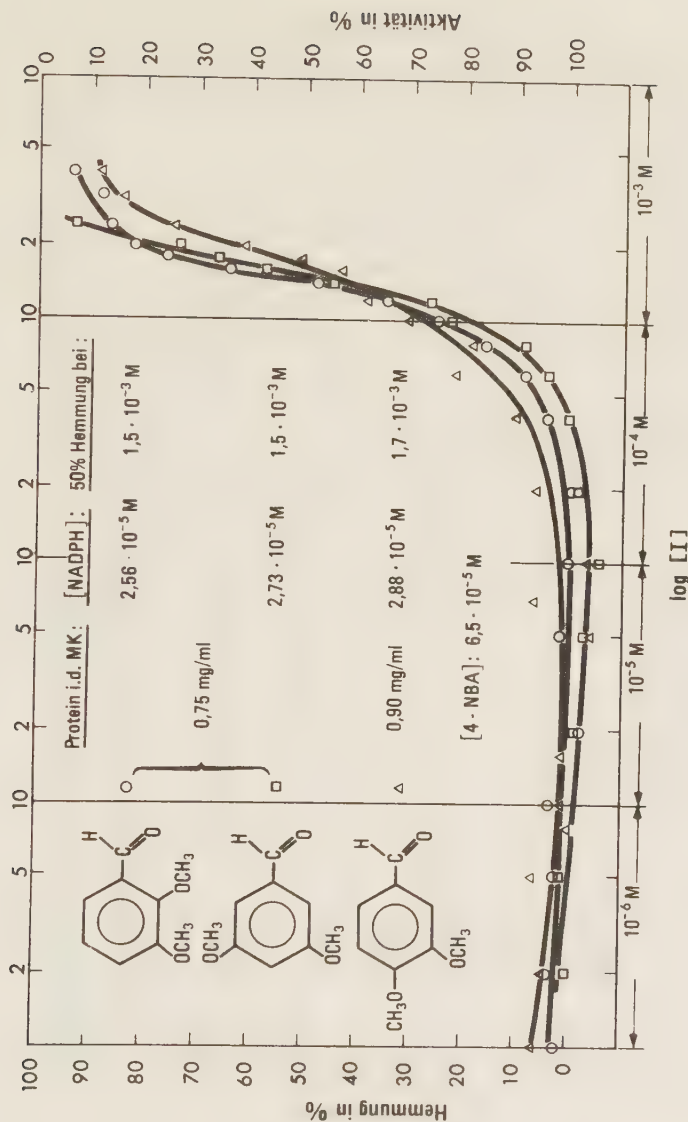


Abb. 22: Die Bestimmung der halbmaximalen Hemmung der Standardreaktion durch 3 isomere Dimethoxybenzaldehyde als Inhibitoren

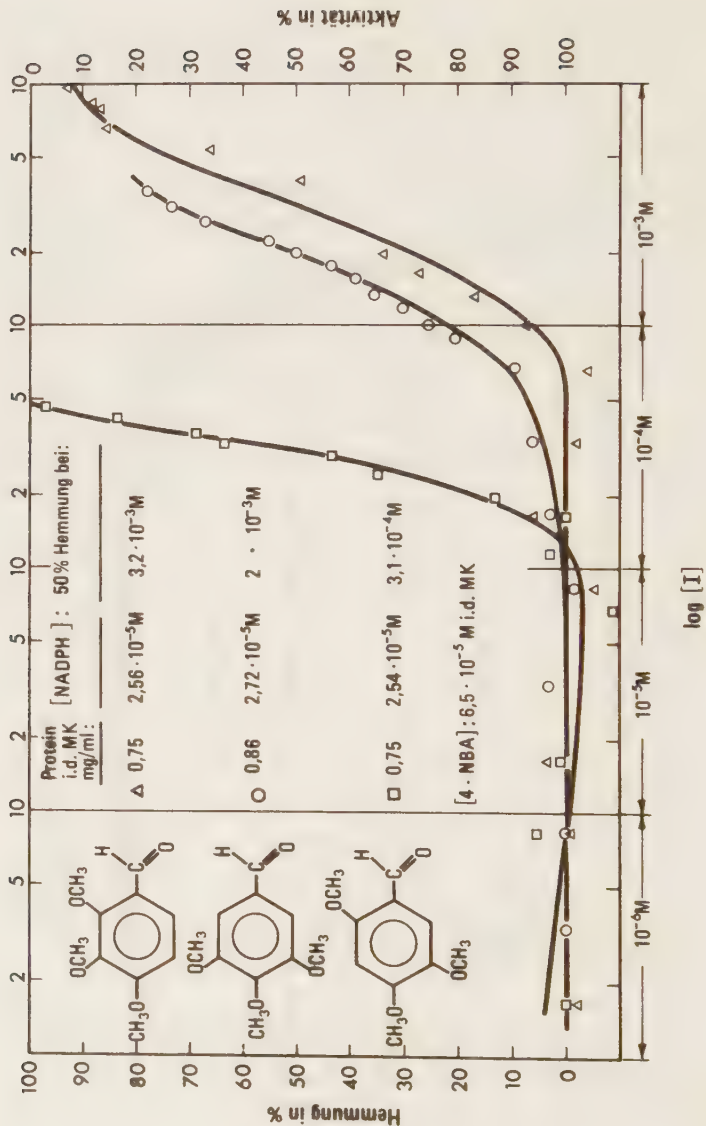


Abb. 23: Die Bestimmung der halbmaximalen Hemmung der Standardreaktion durch 3 isomere Trimethoxybenzaldehyde als Inhibitoren

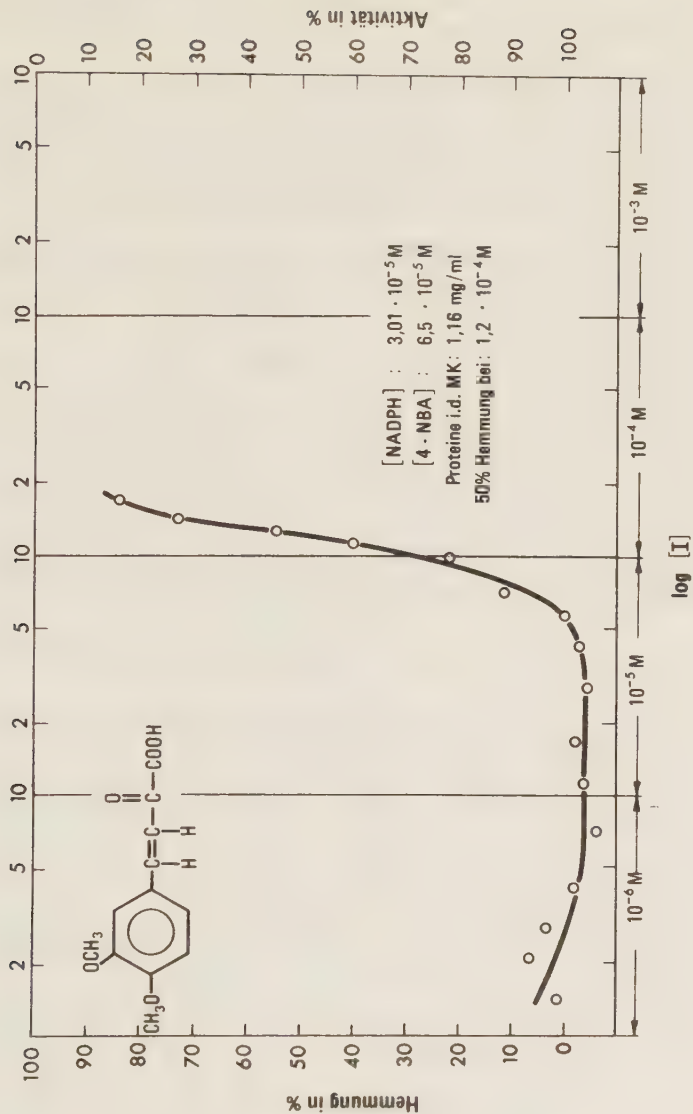


Abb. 24 : Die Bestimmung der halbmaximalen Hemmung der Standardreaktion durch die 4 - (3, 4 - Dimethoxyphenyl) - 2 - oxo - 3 - butensäure

5. Inhibitoren der Aldehyd-Reduktase mit substratähnlicher Struktur

Als Inhibitoren der Aldehyd-Reduktase wurden entsprechend dem Ergebnis der Vortestung die isomeren 2, 4- und 3, 4-Dihydroxybenzaldehyde und die 4-(3, 4-Dimethoxyphenyl)-4-oxo-buttersäure untersucht.

Analog den Untersuchungen zur Substratspezifität der AR verläuft die Enzymaktivität in Gegenwart konstanter Inhibitorkonzentrationen biphasisch-linear (vgl. Abb. 25 A, 27 A/B). Dieses Verhalten war in den verschiedenen Meßreihen reproduzierbar.

In Gegenwart des Inhibitors 4-(3, 4-Dimethoxyphenyl)-4-oxo-buttersäure liegt die Änderung des Reaktionsverhaltens stets in demselben Substratkonzentrationsbereich. In Anwesenheit der isomeren Dihydroxybenzaldehyde tritt die Änderung proportional zur Erhöhung der Substrat- und Hemmstoffkonzentration ein. Dies bedeutet, daß größere Inhibitorkonzentrationen ansteigende Substratkonzentrationen im Reaktionsgemisch erfordern, um den NADPH-Umsatz zu erreichen, der den Umschlagpunkt im Reaktionsverhalten markiert. Er trennt den Bereich hoher Substratkonzentration, in dem die Geraden der Vergleichs- und Hemmreihen im Punkte $-1/k_m$ auf der Abszisse konvergieren, von dem Bereich kleinerer Substratkonzentrationen, in dem die Meßpunkte Parallelen zueinander bilden. Daher liegt die Folgerung nahe, daß zwei verschiedene Hemmtypen in Abhängigkeit von der Substratkonzentration die Reaktion beeinflussen: ein unkompetitiver Hemmechanismus bei kleineren Substratkonzentrationen, ein nichtkompetitiver Hemmechanismus bei größeren Substratkonzentrationen. Darüber hinaus bestätigen die Versuchsreihen, die auf den nichtkompetitiven Hemmtyp hinweisen, den k_m -Wert für 4-NBA ($55 \mu M$). Die berechneten k_m -Werte betragen: 57, 59 und $52 \mu M$. Die Auswertungen nach Dixon sowie Hunter und Downs ergeben ebenfalls zwei Hemmtypen. Die Methode nach Dixon liefert den k_i -Wert des nichtkompetitiven Hemmtyps (vgl. Abb. 25/26 B/27 C) und diejenige nach Hunter und Downs den k_i -Wert für den unkompetitiven Hemmtyp (vgl. Abb. 25/26 C/27 D). Die Tabellen 12 - 14 des Anhangs stellen die verwendeten Inhibitor- und Substratkonzentrationen sowie die kalkulierten k_i -Werte der einzelnen Meßreihen unter dem Gesichtspunkt zweier Hemmtypen zusammen.

a) Dihydroxybenzaldehyde

Die Hemmkonstanten k_i sind für beide untersuchten isomeren Dihydroxybenzaldehyde annähernd gleich. Dies gilt sowohl für den nichtkompetitiven Hemmtyp (k_i : 26, 7 bzw. 11, 4 μM) als auch für den unkompetitiven Hemmtyp (k_i : 20, 6 bzw. 12, 4 μM). Der Konzentrationsbereich, in dem die Substanzen eingesetzt wurden, beträgt minimal 1, 1 und maximal 71 μM .

Es konnte nicht geklärt werden, warum die 2 Meßreihen mit den geringsten Inhibitorkonzentrationen (1, 1 und 2, 3 μM) in der Auswertung nach Hunter und Downs offensichtlich einen k_i -Wert für einen nichtkompetitiven Hemmtyp ergaben, der von demjenigen k_i -Wert differiert, der nach Dixon für diesen Hemmtyp ermittelt wurde: 5, 4 bzw. 5, 7 μM . Mit kleineren Inhibitorkonzentrationen scheint die Affinität des Enzyms zum Inhibitor, der einen nichtkompetitiven Hemmtyp hervorruft, größer zu sein (kleinerer k_i -Wert!). Diese Annahme wird im Lineweaver-Burk-Diagramm deutlich. Die biphasische Linearität bei kleineren Inhibitorkonzentrationen tendiert eindeutig zur einfachen Linearität im Sinne eines nichtkompetitiven Hemmtyps.

b) 4-(3, 4-Dimethoxyphenyl)-4-oxo-buttersäure

Dieser Hemmstoff ist im Vergleich zu den Dihydroxybenzaldehyden weniger wirksam. Die k_i -Werte für den nichtkompetitiven (112 μM) bzw. unkompetitiven Hemmtyp (93, 6 μM) sind annähernd gleich. Die eingesetzten Hemmkonzentrationen waren 10 bis 155 μM . Auch hier läßt die graphische Analyse im Hunter und Downs-Diagramm den Schluß auf einen vorwiegend nichtkompetitiven Hemmtyp in kleineren Inhibitorkonzentrationsbereichen zu, obwohl die k_i -Werte sich nicht wesentlich voneinander unterscheiden und somit keine Änderung der Affinität zwischen Enzym und Inhibitor besteht. Die k_i -Werte entsprechen der IC_{50} des substituentengleichen Testsubstrates 4-(3, 4-Dimethoxyphenyl)-2-oxo-3-butensäure (vgl. Tab. A).

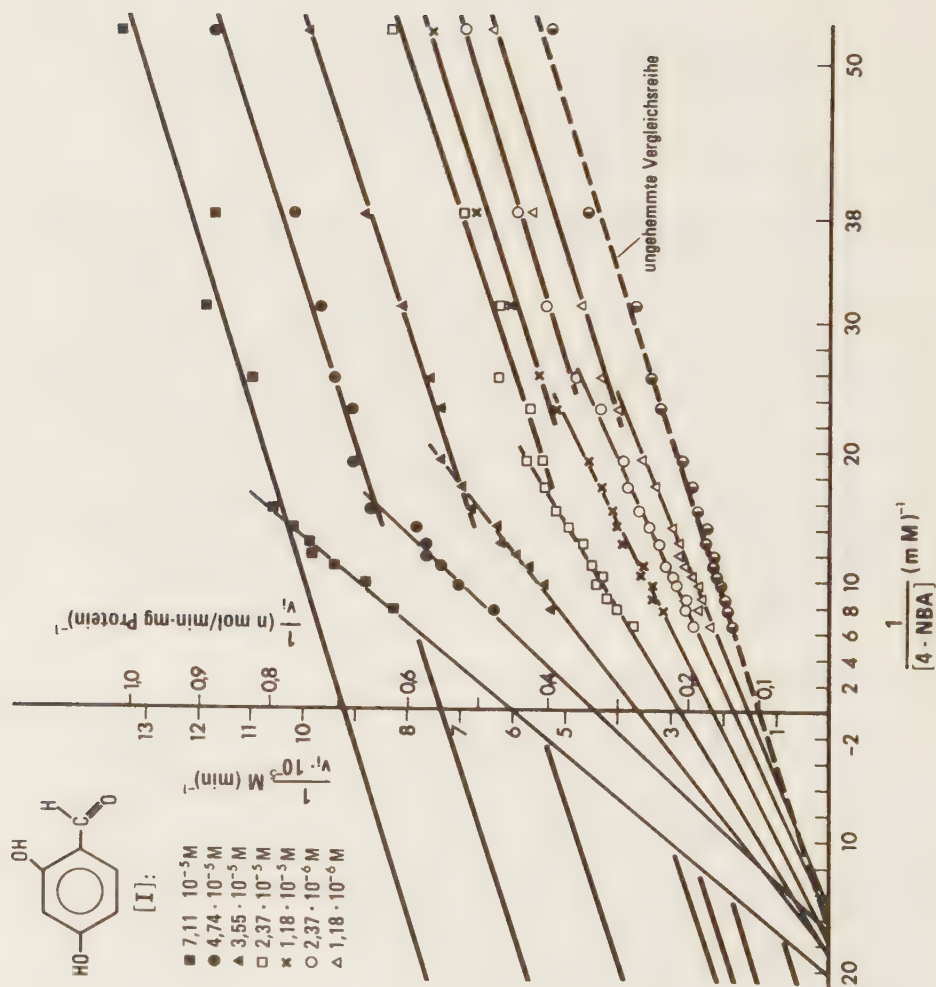


Abb. 25 A : Nach LINEWEAVER - BURK doppelt reziprokes Diagramm der 4 - NBA - Reduktion durch die AR in Gegenwart zunehmender Konzentrationen des Inhibitors 2, 4 - Dihydroxybenzaldehyd (vgl. Tab. 12)

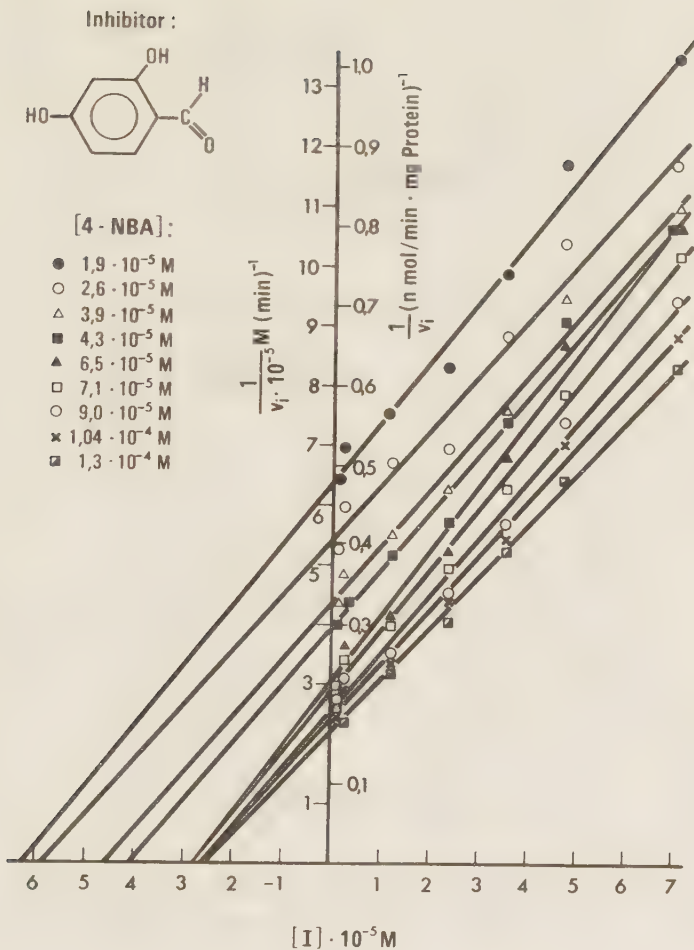


Abb. 25 B : $1/v_i$ gegen $[I]$ - Diagramm nach DIXON bei verschiedenen 4 - NBA - Konzentrationen mit Bestimmung des k_i - Wertes des nichtkompetitiven Hemmtyps
Inhibitor : 2, 4 - Dihydroxybenzaldehyd (vgl. Tab. 12)

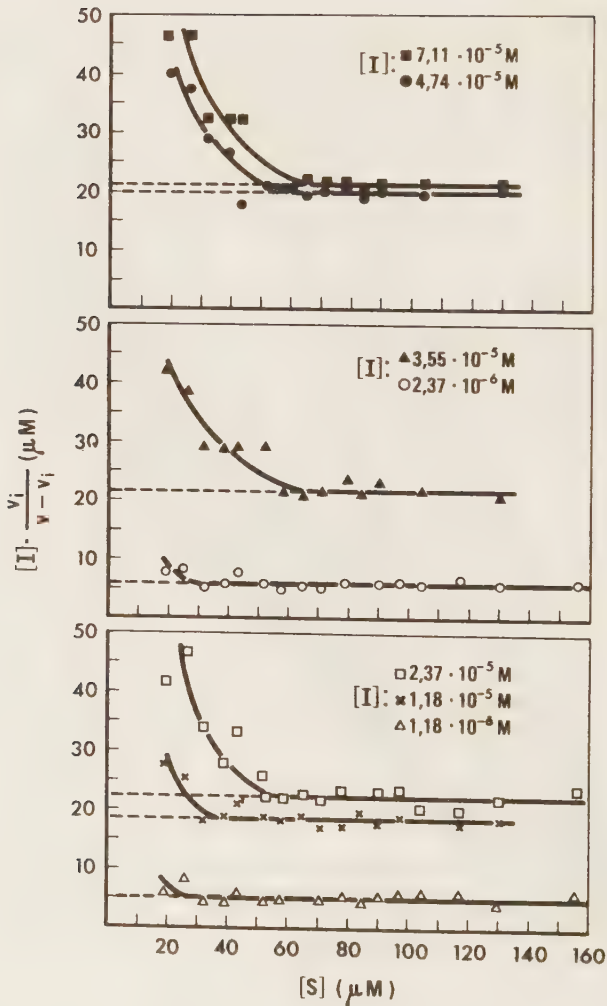


Abb. 25 C: $[I] \cdot \frac{v_i}{v - v_i}$ gegen $[S]$ - Diagramm nach HUNTER und DOWNS bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen mit Bestimmung des k_i - Wertes des unkompetitiven Hemmtyps
Inhibitor: 2,4 - Dihydroxybenzaldehyd (vgl. Tab. 12)

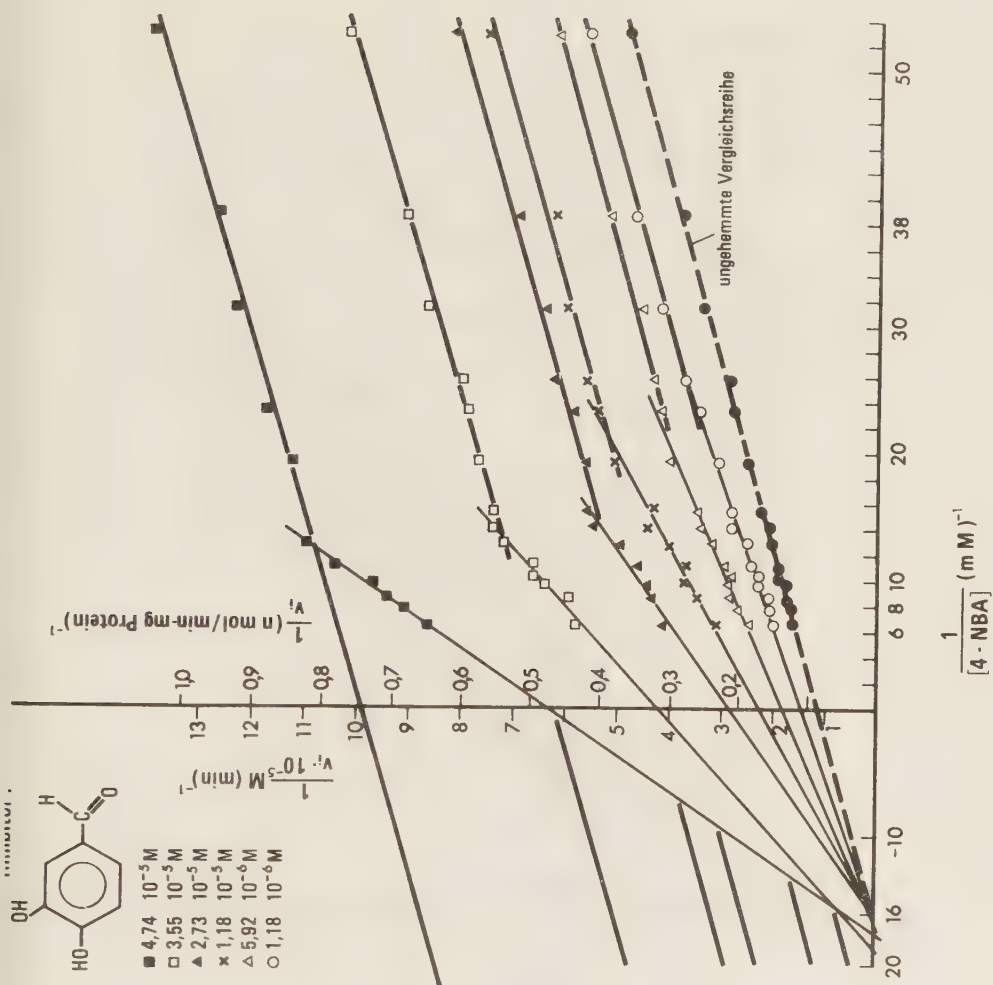


Abb. 26 A : Nach LINEWEAVER - BURK doppelt reziprokes Diagramm der 4 - NBA - Reduktion durch die AR in Gegenwart zunehmender Konzentrationen des Inhibitors 3,4 - Dihydroxybenzaldehyd (vgl. Tab. 13)

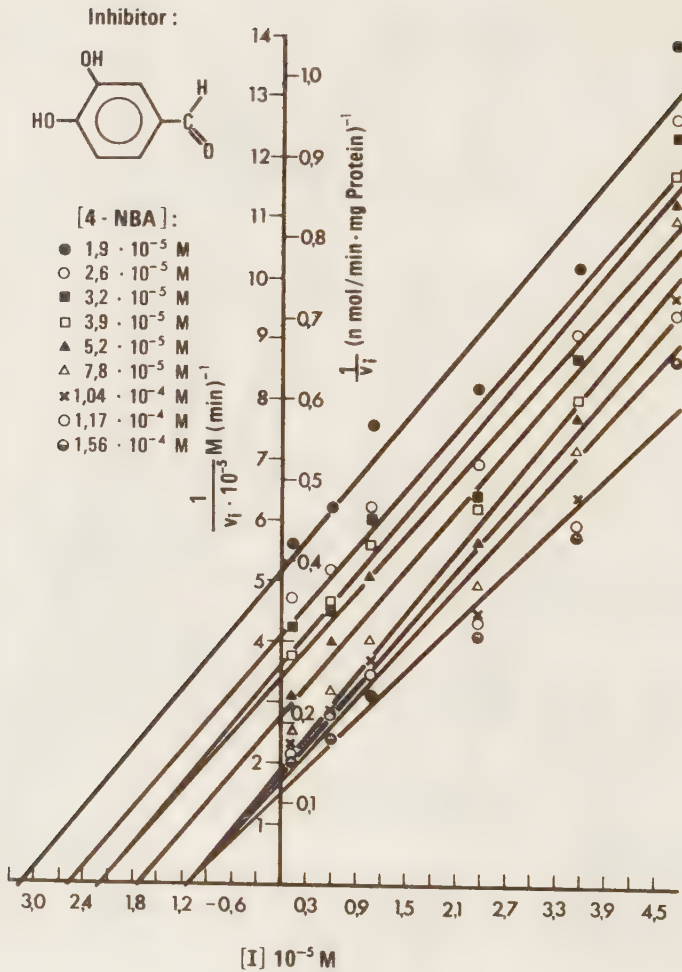


Abb. 26 B : $1/v_i$ gegen $[I]$ - Diagramm nach DIXON bei verschiedenen 4 - NBA -
konzentrationen mit Bestimmung des k_i - Wertes des nichtkompetitiven
Hemmtyps
Inhibitor : 3,4 - Dihydroxybenzaldehyd (vgl. Tab. 13)

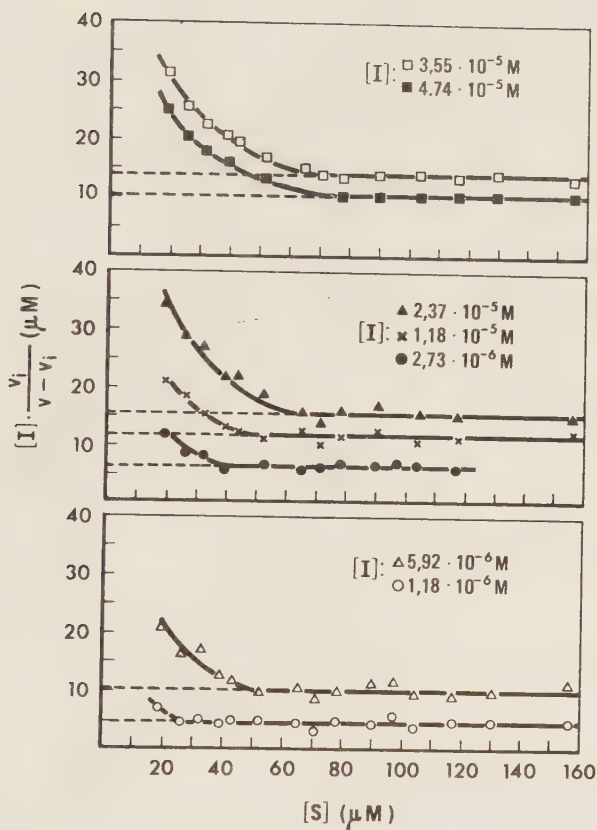


Abb. 26 C: $[I] \cdot \frac{v_i}{v - v_i}$ gegen $[S]$ -Diagramm nach HUNTER und DOWNS bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen mit Bestimmung des k_i -Wertes des unkompetitiven Hemmtyps
Inhibitor: 3,4-Dihydroxybenzaldehyd (vgl. Tab. 13)

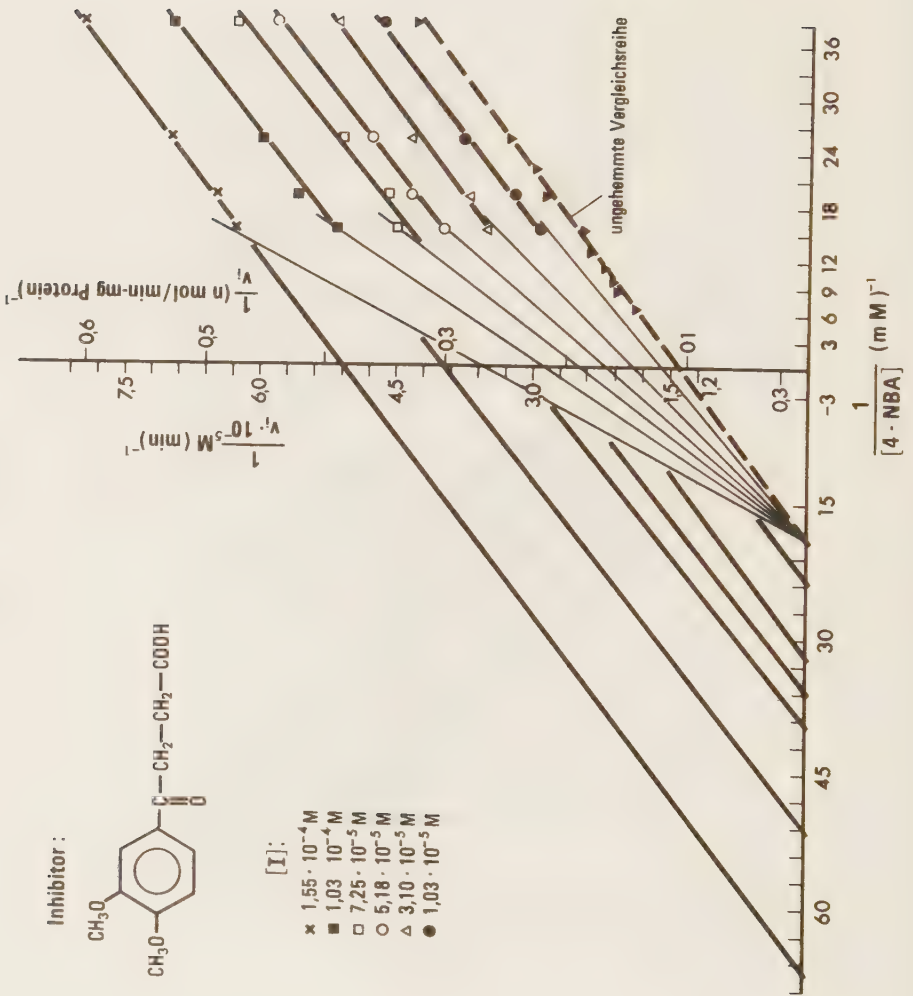


Abb. 27 A : Nach LINEWEAVER - BURK doppelt reziprokes Diagramm der 4 - NBA - Reduktion durch die AR in Gegenwart zunehmender Konzentrationen des Inhibitors 4 - (3, 4 - Dimethoxyphenyl) - 4 - oxo - buttersäure [Gesamtdarstellung (vgl. Tab. 14)]

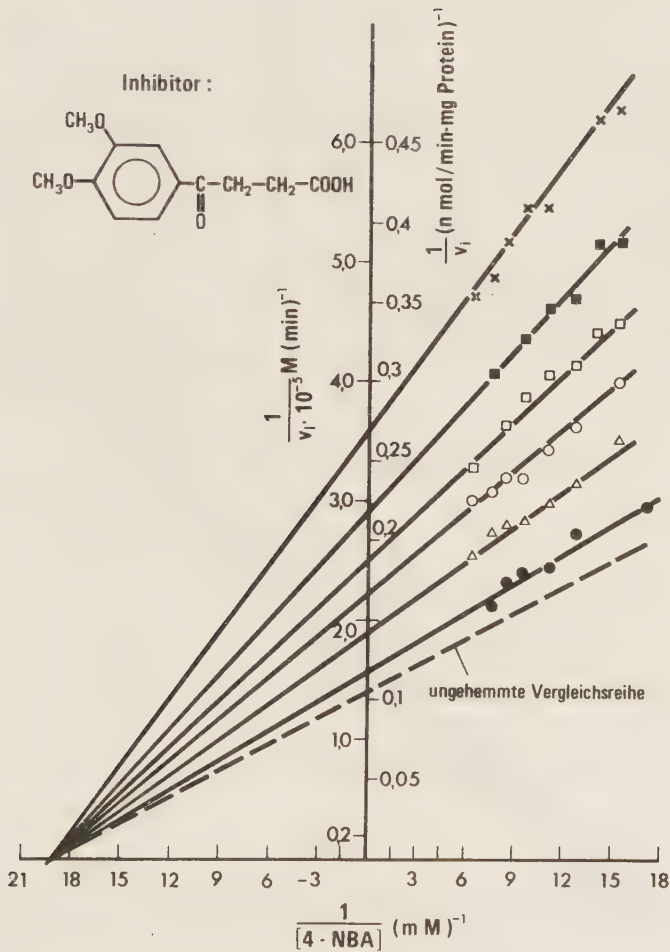


Abb. 27 B : Teildarstellung der Abb.27 A mit Wiedergabe der Meßpunkte im Bereich hoher Substratkonzentrationen

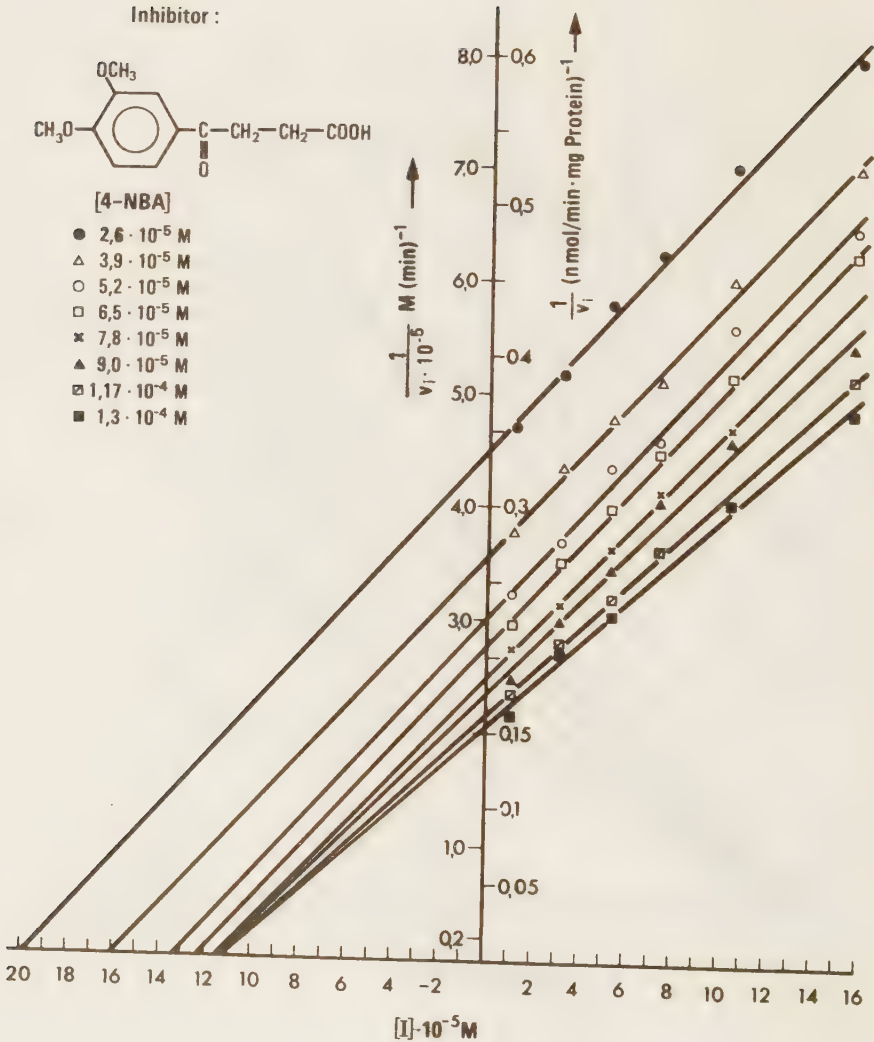


Abb. 27 C : $1/v_i$ gegen $[I]$ – Diagramm nach DIXON bei verschiedenen 4 - NBA - konzentrationen mit Bestimmung des k_i - Wertes des nichtkompetitiven Hemmtyps
 Inhibitor : 4 - (3, 4 - Dimethoxyphenyl) - 4 - oxo - buttersäure
 (vgl. Tab. 14)

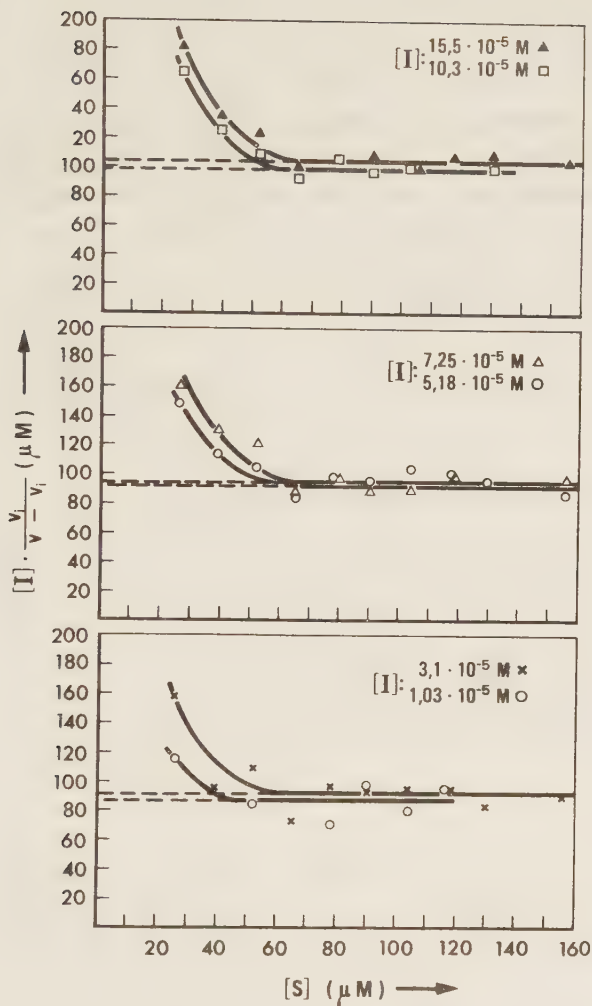


Abb. 27 D: $[I] \cdot \frac{v_i}{v - v_i}$ gegen $[S]$ - Diagramm nach HUNTER und DOWNS bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen mit Bestimmung des k_i - Wertes des unkompetitiven Hemmtyps
 Inhibitor: 4 - (3,4 - Dimethoxyphenyl) - 4 - oxo - buttersäure (vgl. Tab. 14)

Entsprechend der Definition der Hemmkonstanten k_i als Inhibitorkonzentration, die die Geschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion auf die Hälfte verringert, muß für jede Substratkonzentration derselbe Wert für IC_{50} gefunden werden. Diese Forderung läßt sich anhand der Lineweaver-Burk-Diagramme überprüfen. Dazu wird derjenige Meßpunkt für $1/v$ aufgesucht und nach v umgerechnet, der die Hälfte der ungehemmten Umsatzgeschwindigkeit repräsentiert. Die in Tabelle B dargestellten Ergebnisse bestätigen am Beispiel zweier Substratkonzentrationen, daß die nach Dixon bzw. Hunter und Downs ermittelten k_i -Werte der untersuchten Hemmstoffe der IC_{50} gleich sind und bekräftigen damit die Richtigkeit der Hemmkonstanten.

Tabelle B: Die Überprüfung des k_i -Wertes im Lineweaver-Burk-Diagramm

Testinhibitor (vgl. Abb. Nr.)	nach Dixon bzw. Hunter und Downs bestimmter mittlerer k_i -Wert ($\pm$ SD:)	Überprüfung des k_i -Wertes bei [S]	Reaktionsge- schwindigkeit v der ungehemm- ten Vergleichs- reaktion (nMol/ml·min)	halbmaximale Reaktionsge- schwindigkeit der gehemm- ten Reaktion (nMol/ml·min)	IC ₅₀
2, 4-Dihydroxy- benzaldehyd (Abb. 25 A)	2, 36 $\pm$ 0, 3 · 10 ⁻⁵ M	6, 5 · 10 ⁻⁵ M	3, 95	1, 93	2, 37 · 10 ⁻⁵ M
		11, 7 · 10 ⁻⁵ M	4, 99	2, 36	
3, 4-Dihydroxy- benzaldehyd (Abb. 26 A)	1, 19 $\pm$ 0, 05 · 10 ⁻⁵ M	6, 5 · 10 ⁻⁵ M	4, 46	2, 31	1, 18 · 10 ⁻⁵ M
		11, 7 · 10 ⁻⁵ M	5, 79	2, 87	
4-(3, 4-Dimethoxy- phenyl)-4-oxo- buttersäure (Abb. 27 A)	1, 02 $\pm$ 0, 1 · 10 ⁻⁴ M	6, 5 · 10 ⁻⁵ M	4, 05	1, 93	1, 03 · 10 ⁻⁴ M
		13, 0 · 10 ⁻⁵ M	5, 02	2, 46	

Gibt man die für Substratsättigung geltenden theoretisch-maximalen Umsatzgeschwindigkeiten der Hemmreihen in Prozent des $v_{\max}$ -Wertes der ungehemmten Vergleichsreihen an, so läßt sich die Zunahme der Hemmung in Abhängigkeit von der eingesetzten Inhibitorkonzentration bestimmen. Ein solcher $v_{\max}$ -Vergleich zwischen ungehemmter und gehemmter Reaktion ist jedoch nur für die nichtkompetitive Hemmung durchführbar. Für die Berechnung der prozentualen Hemmung vom unkompetitiven Hemmtyp wird der Hemmungsgrad im kleineren Substratkonzentrationsbereich für die ausgewählten Inhibitorkonzentrationen als Mittelwert der prozentualen Hemmung bei 4 bzw. 5 Substratkonzentrationen angegeben. Alle Daten sind wiederum aus den Lineweaver-Burk-Diagrammen der Abb. 25 A - 27 A ablesbar, wobei nur je 3 Hemmreihen mit 3 verschiedenen Inhibitorkonzentrationen in die Betrachtung einbezogen wurden. Tab. C führt das für alle 3 Inhibitoren abgeleitete Ergebnis auf: Die ansteigenden Hemmstoffkonzentrationen können über 1 - 2 Molaritätsstufen die Aktivität der Aldehyd-Reduktase proportional hemmen. Das Ausmaß der nichtkompetitiven Hemmung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit beträgt bis zu 80 %. Die unkompetitive Hemmung der absoluten Reaktionsumsätze ist ähnlich bzw. bei stärkerer Hemmung etwas geringer ansteigend.

Tabelle C : Der Grad der Hemmung in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration

Test-inhibitor	$V_{\max}$ der ungehemmten Vergleichsreaktion (nMol/min. mg Prot.) ± 0 % Inhibition	$[I]$ in M	nichtkompetitive Hemmung		unkompetitive Hemmung
			$V_{\max}$ der gehemmten Reaktion (nMol/min. mg Prot.)	± Inhibition in %	
2, 4-Dihydroxybenzaldehyd	11.8	$1.18 \cdot 10^{-6}$	8.53	23,7	$18.0 \pm 4.8 \%$ (n = 5)
		$2.37 \cdot 10^{-5}$	4.69	60,3	$39.8 \pm 5.9 \%$ (n = 5)
		$7.11 \cdot 10^{-5}$	2.19	81,4	$65.6 \pm 4.3 \%$ (n = 5)
3, 4-Dihydroxybenzaldehyd	10.1	$1.18 \cdot 10^{-6}$	9.42	6,7	$18.2 \pm 2.7 \%$ (n = 5)
		$1.18 \cdot 10^{-5}$	5.87	41.9	$42.8 \pm 5.9 \%$ (n = 5)
		$4.74 \cdot 10^{-5}$	2.10	79,2	$72.0 \pm 6.2 \%$ (n = 5)
4-(3, 4-Dimethoxy-phenyl)-4-oxo-buttersäure	9.5	$1.03 \cdot 10^{-5}$	8.48	10,8	$11.3 \pm 2.3 \%$ (n = 4)
		$1.03 \cdot 10^{-4}$	4.61	51,5	$45.7 \pm 5.7 \%$ (n = 4)
		$1.55 \cdot 10^{-4}$	3.73	60,7	$53.5 \pm 7.5 \%$ (n = 4)

D. DISKUSSION

Biogene Aldehyde sollen aufgrund ihres sedativen Effektes nach SABELLI et al. (57), ERWIN (23) und JOUVET (35) am Mechanismus des Schlaf-Wach-Rhythmus beteiligt sein. Nach BAROFSKI (3) und GESSNER (28) haben sie auch eine Kontrollfunktion bei der Aufrechterhaltung der Körpertemperatur. Von TABAKOFF und KRIVCHENKOVA ist eine Beeinflussung des Sauerstoffverbrauchs der Hirnzelle durch biogene Aldehyde in vitro festgestellt worden: sie hemmen die Na^+ -, K^+ - und Mg^{++} -abhängige ATPase (65) und die Cytochrom-c-oxidase (39). Die von APPEL und PARROT (1) und BARONDES (4) in vitro beobachtete Aktivitätszunahme des Pentose-Phosphat-Zyklus in Synaptosomen der Rattenhirnrinde und Zellen des vorderen Hypophysenlappens in Gegenwart von Noradrenalin und Serotonin erklären TABAKOFF et al. mit einer direkten Einflußnahme biogener Aldehyde (66).

Um die Funktion biogener Aldehyde im ZNS weiter zu erhellen, sind zahlreiche Untersuchungen zur Substratspezifität und zur Hemmbarkeit des Enzyms Aldehyd-Reduktase durch zentral wirksame Substanzen unternommen worden. Arbeiten von BRONAUGH, DAVIS, DEITRICH, ERWIN und TABAKOFF vor allem mit dem teilgereinigten Rinderhirnenzym (11, 16, 23, 25, 61, 62) zeigten in den Jahren 1970 - 1973 übereinstimmend eine Hemmung der AR durch verschiedene Hypnotika und Antikonvulsiva in vitro. RIS und v. WARTBURG erhärteten diese Befunde mit den AR-Isoenzymen des Menschen- und Rattengehirns (54, 55). Hier erwies sich mit wenigen Ausnahmen nur das Hauptenzym jeder Spezies als wirksam.

Darüber hinaus wird die AR in vitro kompetitiv durch Neuroleptika der Phenothiazin-Reihe (10) und durch Chlorprothixen (55) gehemmt. Dieser Befund wird im Prinzip von O'KEEFFE et al. (36) und NYBACK et al. (50) mit Chlorpromazin in vivo bestätigt.

Andere Neuroleptika (Promazin, Haloperidol), Antidepressiva (Imipramin, Amphetamin, Iproniazid) und Tranquilizer wie Diazepam und Meprobamat haben nach RIS und von WARTBURG keinen Einfluß auf die Menschen- und Rattenhirn-AR (54, 55). Die einzelnen Inhibitoren sind in Tabelle D zusammengestellt. Variable Substrate der Hemmreaktion waren neben 4-NBA auch p-Hydroxyphenylglycolaldehyd, Indolacetaldehyd und NADPH.

Tabelle D : Pharmaka mit zentraler Wirkung als Inhibitoren der
Aldehyd-Reduktase in vitro

Inhibitor	k_i -Wert bei pH 7,0	Hemmtyp	Autor
<u>Barbiturate:</u>			
Amobarbital	0,28 mM	nicht-kompetitiv	23, 25
Phenobarbital	0,15 mM	nicht-kompetitiv	11, 61
	0,30 mM		23, 25
Pentobarbital	0,15 mM	nicht-kompetitiv	11, 61
	0,40 mM		23, 25
Allobarbital	-	-	54
Barbital	0,12 mM	-	23, 25, 54
Amobarbitalalkohol	0,60 mM	-	23
Barbitursäure	4,00 mM	-	23
d-Mephobarbital	0,81 mM	nicht-kompetitiv	23, 55
l-Mephobarbital	0,66 mM	nicht-kompetitiv	23, 55
Carbromal	-	-	55
Bromisoval	-	-	55
<u>Glutarimide:</u>			
Glutethimid	-	-	55
<u>Hydantoine:</u>			
Diphenylhydantoin	0,17 mM	nicht-kompetitiv	11, 25, 55
Ethotoin	40,00 mM	nicht-kompetitiv	25
Hydantoin	12,00 mM	nicht-kompetitiv	25
<u>Oxazolidinderivate:</u>			
Dimethadion	0,47 mM	gemischt	25
Trimethadion	2,30 mM	nicht-kompetitiv	25
Paramethadion	4,90 mM	nicht-kompetitiv	25
<u>Succinimide:</u>			
Ethosuximid	0,54 mM	nicht-kompetitiv	25
Methsuximid	5,00 mM	nicht-kompetitiv	25
Phensuximid	7,00 mM	nicht-kompetitiv	25
<u>Phenothiazinderivate:</u>			
Chlorpromazin	0,36 mM	kompetitiv	11, 61, 69
Trifluoperazin	0,32 mM	kompetitiv	10
Thioridazin	0,51 mM	kompetitiv	10
Promethazin	4,50 mM	kompetitiv	10
Chlorprothixen	-	-	54

- bedeutet keine nähere Angabe

Die Aldehyd-Reduktase wird durch Barbiturate, Hydantoine, Oxazolidindione und Succinimide, die die gemeinsame chemische Teilstruktur $-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-$ besitzen, nichtkompetitiv gehemmt. Die einzige Ausnahme bilden 2,4-Oxazolidindione wie Dimethadion. Sie reagieren nach einem gemischten Hemmtyp (25).

Weitere Hypnotika wie das Glutarimid Glutethimid und die Monoureide Carbmomal und Bromisoval sind ebenfalls Inhibitoren (55). Der Metabolit des Amobarbital, Amobarbitalalkohol, und die Barbitursäure zeigen durch höhere k_1 -Werte eine geringere Hemmwirkung an. Das Antiepileptikum Primidon, von dem angenommen wird, daß es erst nach Biotransformation zum Phenobarbital wirkt (73), ist kein Inhibitor. Ebenfalls ohne Hemmwirkung ist das Anticholinergicum Phenglutarimid. RIS und v. WARTBURG fanden eine unterschiedliche Inhibitorspezifität einer Isoenzymfraktion des Menschengehirns für die R(+)- und S(-)-Stereoisomeren einiger Succinimide. Im Vergleich untereinander scheinen die einzelnen Isoenzyme unabhängig von der Aktivität der Isoenzymfraktion durch denselben Inhibitor z. T. unterschiedlich hemmbar zu sein.

Aufgrund dieser differenzierten Inhibitorspezifität halten die Autoren eine Beteiligung der Isoenzyme bei der antikonvulsiven Wirkung dieser Substanzen für wahrscheinlich (55). Eine mögliche Erklärung des bisher unbekannten Wirkungsmechanismus der genannten Pharmaka liegt in der erhöhten Konzentration einzelner biogener Aldehyde. Diese kann durch die Hemmung der Aldehyd-Reduktase-Reaktion in vivo verursacht werden.

Verschiedene aliphatische und aromatische Aldehyd-Substrate mit ihren k_m -Werten und maximalen Umsatzgeschwindigkeiten sind in den Tabellen E und F zusammengestellt, die unter z. T. vergleichbaren Reaktionsbedingungen in vitro bestimmt wurden. Hinsichtlich der maximalen Umsatzgeschwindigkeiten fällt zunächst auf, daß Aldehyde der Phenyläthylamine offenbar bessere Substrate der AR sind als aliphatische Aldehyde und Benzaldehyde, wobei die Aldehyde des Octopamin und des Noradrenalin, β -OH-phenylglycolaldehyd und 3,4-Dihydroxyphenylglycolaldehyd, im Vergleich zu den Aldehyden ohne β -OH-Gruppe höhere Umsatzgeschwindigkeiten aufweisen. Als

Tabelle E : Substrate der Aldehyd-Reduktase in vitro

Substrat	k_m -Wert (μM)	v_{max} (nMol NADPH/ min·mg Prot.)	Spezies und Reaktions- bedingungen nach Ref.	
Acetaldehyd	1000,0 (mM)	-	Schwein	68
	-	-	M + R	54
Propionaldehyd	330,0 (mM)	-	M + R	54
Butyraldehyd	40,0 (mM)	-	M + R	54
Decanaldehyd	-	22	Rind	61
Palmitylaldehyd	-	14	Rind	61
Lactaldehyd	3,7 (mM)	-	Schwein	68
Glycerinaldehyd	4,7 (mM)	-	Schwein	68
Benzaldehyd (BA)	17,0 μM	22	Rind	61
	-	-	M + R	54
m-Chloro-BA	7,0 μM	43	Rind	61
p-Chloro-BA	-	-	M + R	54
p-Carboxy-BA	4,0 μM	43	Rind	61
	45,0 μM	-	Schwein	68
p-Cyano-BA	5,0 μM	36	Rind	61
p-Hydroxy-BA	-	-	M + R	54
m-Hydroxy-BA	-	-	M + R	54
p-Methoxy-BA	141,0 μM	12	Rind	61
m-Methoxy-BA	27,0 μM	32	Rind	61
3-Methoxy-4-Hydroxy-BA	-	-	M + R	54
m-Nitro-BA	-	-	Mensch	54
4-Nitro-BA	130,0 μM	-	Schaf	70
	70-80,0 μM	-	Rind	13
	6,0 μM	71	Rind	61
	9,7 μM	205	Affe	11
	290,0 μM	-	Schwein	69
	55,0 μM	10	Ergebnis dieser Arbeit	
Phenylacetaldehyd	-	24		61
3-Phenylpropionaldehyd	-	-	M + R	54
2-Phenylpropionaldehyd	-	-	M + R	54
p-Hydroxyphenylacetaldehyd	57,0 μM	138	Rind	61
	850,0 μM	-	Schwein	68
p-Hydroxy-phenylglycolaldehyd	16,0 μM	253	Rind	61
	22,0 μM	317	Affe	11
	65,0 μM	-	Schwein	68
3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd	6,0 μM	211	Affe	11
3,4-Dihydroxyphenylglycolaldehyd	12,0 μM	645	Affe	11
Indolacetaldehyd	40,0 μM	-	Rind	61
	-	-	M + R	54
5-Hydroxyindolacetaldehyd	27,0 μM	123	Affe	11
Pyridin-3-carboxyaldehyd	400,0 μM	-	Schaf	70
	-	-	M + R	54
	-	-	Rind	8

- bedeutet keine näheren Angaben M + R: Mensch bzw. Ratte

Tabelle F : k_m -Werte der Isoenzyme der AR

Substrat	high- k_m - Wert der Isoenzyme des Schwei- negehirns (68, 69) (μM)	low- k_m - Wert	k_m -Werte der Hirn- isoenzyme der Ratte und des Menschen (54) (μM)
4-NBA	290, 0	1, 3	<u>Mensch:</u> I: 148, 0 II: 9, 0 III: 45, 0 IV: 55, 0 <u>Ratte:</u> I: 40, 0 II: 6, 0
p-Hydroxy- phenylacetaldehyd	85, 0	2, 3	-
p-Hydroxy- phenylglycol- aldehyd	65, 0	0, 7	-
Indol-3-acet- aldehyd	2000, 0	9, 5	-

weitere Aldehyd-Substrate erwiesen sich 5-OH-indolacetaldehyd, das Derivat des Serotonin, Indol-3-acetaldehyd und Pyridin-3-carboxyaldehyd. Aus den Arbeiten mit Isoenzymen ergeben sich z. T. verschiedene Michaelis-Konstanten für ein und dasselbe Substrat, die die unterschiedliche Affinität der Isoenzyme zum Substrat anzeigen. In Tabelle F sind die in der Literatur angegebenen high- und low- k_m -Werte für einige Substrate aufgeführt. Für das Standardsubstrat 4-NBA liegen die k_m -Werte in Bereichen von 1 bis 300 μM . An diesem Beispiel wird auch deutlich, daß die k_m -Werte bei den einzelnen Spezies keineswegs gleich sind.

Der in dieser Arbeit bestimmte (high)- k_m -Wert der Rinderhirn-AR für 4-NBA entspricht mit 55 μM den Werten für die Hauptisoenzyme des Menschen- und des Rattengehirns sowie der Angabe für das Rinderenzym von CHRIST (13), weicht jedoch deutlich von denen der Schweinehirnisoenzyme ab. Der Unterschied zum k_m -Wert für Rind nach TABAKOFF und ERWIN (61) von einer Zehnerpotenz muß mit Differenzen in der Präparation erklärt werden.

Größere Übereinstimmung der Michaelis-Konstanten für alle Spezies wird für das Coenzym NADPH erreicht: 1, 2 - 7, 3 μM (11, 13, 55, 61, 68 - 70). 2, 8 μM als Ergebnis dieser Arbeit fügt sich in den Mittelbereich ein und entspricht den Angaben für das Rinderenzym.

Die Hinweise auf die Existenz mehrerer Isoenzyme der AR des Gehirns (8, 24, 54, 55, 69) werden durch die Ergebnisse dieser Arbeit ergänzt. Für alle Testsubstrate wurden aufgrund ihres biphasischen Verhaltens im Lineweaver-Burk-Diagramm in Abhängigkeit von der Substratkonzentration zwei verschiedene Michaelis-Konstanten erhalten, die einer high- und low- k_m -AR zugeordnet werden können. Die Untersuchungen mit Inhibitoren ergeben mit Zunahme der Inhibitor- und Substratkonzentration einen Wechsel des Hemmverhaltens. Die unkompetitive Hemmung im Bereich niedriger Substratkonzentrationen (low- k_m -AR) wird einheitlich nichtkompetitiv im Bereich höherer Substratkonzentrationen (high- k_m -AR). Dies kann als Einfluß zweier Isoenzyme gedeutet werden. Die Hemmkonstanten sind dabei nicht wesentlich verschieden.

Untersuchungen von TURNER und HICK über die Hemmwirkung von Homovanillinsäure (70), dem physiologischen Endprodukt des oxidativen Abbaus des Dopamins durch die Aldehyd-Dehydrogenase, stellten 1975 ebenfalls einen unkompetitiven Hemmtyp in der AR-Reaktion fest, der mit steigenden Inhibitorkonzentrationen nichtkompetitiv wird. Die Hemmung der AR durch biogene Säuren ist in vivo jedoch wahrscheinlich ohne Bedeutung, da die notwendigen hohen Inhibitorkonzentrationen nicht erreicht werden. Die Bedeutung der Existenz von Isoenzymen kann nach RIS und von WARTBURG (54) in ihrer unterschiedlichen Affinität zu den physiologischen Aldehyden liegen, wie es für die Monoaminoxidase A und B und ihre Substrate bekannt ist (49). Möglicherweise sind sie für den Abbau bestimmter biogener Amine verantwortlich. Die unterschiedliche Konzentration und Verteilung der Isoenzyme in verschiedenen Hirnarealen (noradrenerge - serotonerge Bahnen) würde diese Hypothese unterstützen.

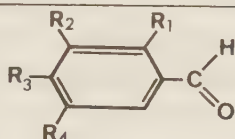
TURNER und TIPTON diskutieren die Möglichkeit, daß die aktivere k_m -AR erst mit steigenden Aldehyd-Konzentrationen (z. B. bei Aldehyd-Dehydrogenase-Hemmung) den Abbau katalysiert (69).

BRONAUGH und ERWIN (10) haben 1972 den Reaktionsmechanismus der AR-Reaktion aufgrund ihrer Befunde zur Produkthemmung und der Hemmung durch Phenothiazin-Derivate als "random order of addition" charakterisiert (vgl. Abschn. C. 2). Nach THEORELL et al. (67) erfolgt dagegen der Ablauf der Alkohol-Dehydrogenase-Reaktion in der Leber in geordneter Sequenz. Das Substrat verbindet sich erst nach dem Coenzym mit dem Enzymprotein. Die Untersuchungsergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen eindeutig für eine ungeordnete Reaktionsreihenfolge im Sinne der random order. Substrat und Coenzym können gleichzeitig an das aktive Zentrum des freien Enzymproteins gebunden werden.

Aus der Reihe der in dieser Arbeit untersuchten -OH und -OCH₃-substituierten Benzaldehyde(BA)(vgl. Tab A im Abschnitt C. 3.) erwiesen sich die Dimethoxy-BA als eindeutige AR-Substrate unabhängig von der Stellung der Methoxy-Gruppen am Benzolring.

Der symmetrische 3, 4, 5-Trimethoxy-BA, der mit dem Mescaline (3, 4, 5-Trimethoxyphenyläthylamin) strukturverwandt ist, ist Aldehyd-Substrat im

Tabelle G : Vergleich der Substrat- und Inhibitoreigenschaften
-OH- und -OCH₃-substituierter Benzaldehyde (BA)



	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	
3-Methoxy-BA	-	-OCH ₃	-	-	Substrat (61)
4-Methoxy-BA	-	-	-OCH ₃	-	Substrat (61)
2, 3-Dimethoxy-BA	-OCH ₃	-OCH ₃	-	-	Substrat
3, 4-Dimethoxy-BA	-	-OCH ₃	-OCH ₃	-	Substrat
3, 5-Dimethoxy-BA	-	-OCH ₃	-	-OCH ₃	Substrat
3, 4, 5-Trimethoxy-BA	-	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	Substrat
2, 3, 4-Trimethoxy-BA	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-	kein Substrat kein Inhibitor
2, 4, 5-Trimethoxy-BA	-OCH ₃	-	-OCH ₃	-OCH ₃	kein Substrat Inhibitor (?)
3-Hydroxy-BA	-	-OH	-	-	Substrat (54)
4-Hydroxy-BA	-	-	-OH	-	Substrat (54)
2, 4-Dihydroxy-BA	-OH	-	-OH	-	Inhibitor
3, 4-Dihydroxy-BA	-	-OH	-OH	-	Inhibitor
Vanillin	-	-OCH ₃	-OH	-	Inhibitor (13)
Isovanillin	-	-OH	-OCH ₃	-	kein Substrat kein Inhibitor(13)

Gegensatz zu den 2, 3, 4- und 2, 4, 5-OCH₃-substituierten Benzaldehyden, die weder als Substrat noch eindeutig als Inhibitoren zu charakterisieren waren. Die ermittelten k_m -Werte liegen zwischen 5, 9 und 130 μ M. Die Reaktionsgeschwindigkeiten der untersuchten Substrate sind verglichen mit dem Standardsubstrat 4-NBA gering (6 - 22 % bzw. 0, 61 - 2, 12 nMol/min·mg Protein bei 28 μ M NADPH).

Aus dem Vergleich der Substrat- und Inhibitoreigenschaften der Testsubstanzen lassen sich folgende Aussagen zur Struktur-Wirkungsbeziehung ablesen (Tabelle G, ergänzt durch Ergebnisse anderer Autoren):

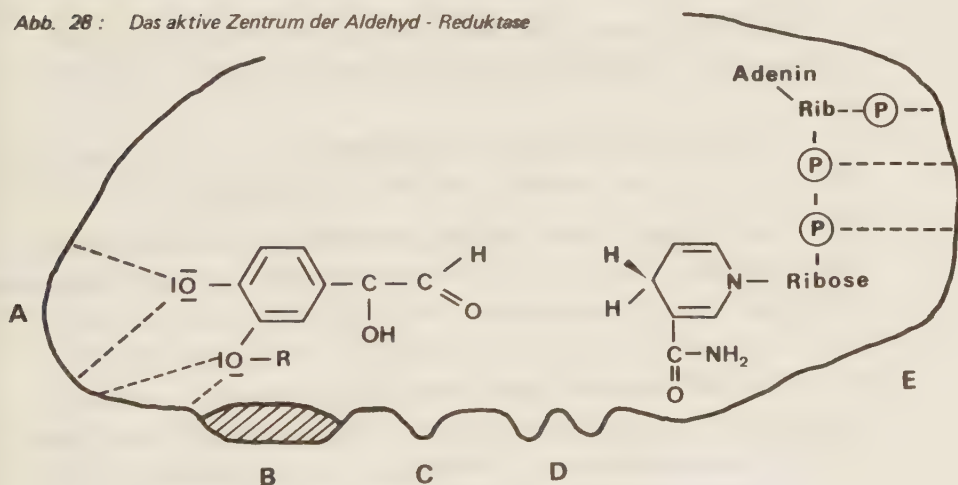
1. Benzaldehyde, die nur einen OH- oder OCH₃-Substituenten tragen, werden als Substrate angenommen.
2. Benzaldehyde mit zwei Substituenten sind Substrate, wenn die Substituenten OCH₃-Gruppen sind.
3. Dihydroxy- und Hydroxy-Methoxy-Benzaldehyde sind keine Substrate und in den meisten Fällen Inhibitoren.
4. Benzaldehyde mit drei Substituenten sind Substrate, wenn -OCH₃ nicht an R₁ substituiert ist.
5. Zusammenfassend läßt sich durchaus ein Einfluß der Substituenten am Benzolring auf die Substrat- bzw. Inhibitoreigenschaften des Moleküls feststellen. Es scheint in erster Linie die chemische Struktur der Substituenten (OH-Gruppe) und erst in zweiter Linie ihre Anzahl und Stellung am Benzolring von Bedeutung zu sein. Die Kombination der -OH- und -OCH₃-Gruppen bestimmt möglicherweise die Reihenfolge des Abbaus biogener Amine durch die Catecholamin-O-Methyl-Transferase und die Aldehyd-Reduktase.

Die Untersuchungen dieser Arbeit lassen jedoch einen zwingenden Rückschluß auf die Substratfähigkeit der physiologischen Aldehydderivate der Phenyläthylamine nicht zu.

Es läßt sich aber eine Vorstellung über ein aktives Zentrum der Aldehyd-Reduktase mit folgenden Regionen gewinnen:

- A : Region zur Bindung von -OH- und/oder -OCH₃-Gruppen des Benzolringes.
- B : Areal zur Aufnahme eines aromatischen Ringsystems (auch Indolringe).
- C : Region zur Bindung einer Seitenketten-OH-Gruppe.
- D : Region zur Bindung der Aldehyd-Gruppe und des Nicotinamid-Restes des NADPH.
- E : Areal zur Aufnahme der Ribose-, Phosphat- und Adeninanteile des NADPH.

Abb. 28 : Das aktive Zentrum der Aldehyd-Reduktase



Die Abstände der Regionen zueinander müßten dabei so beschaffen sein, daß ringsubstituierte Phenylglycolaldehyde genau in das aktive Zentrum passen. Veränderungen an der aliphatischen Seitenkette, z.B. Ersatz der β -OH-Gruppe durch Wasserstoff (Phenylacetaldehyde) oder Verkürzung um ein C-Atom (Benzaldehyde) beeinflussen wahrscheinlich die Bindung der Aldehyde und damit die Wasserstoffübertragung an der Region "D" ungünstig.

Von großer Bedeutung für die Reduktion der Aldehyde ist möglicherweise die Fixierung des Moleküls durch Ringsubstituenten (OH- und -OCH₃-Gruppen)

an die Region "A". Es ist auffällig, daß Benzaldehyde, die eine Methoxy- und Hydroxygruppe bzw. zwei Hydroxygruppen besitzen, durch die Aldehyd-Reduktase nicht reduziert werden und in der Regel Inhibitoren darstellen. Vielleicht werden diese Verbindungen an die Regionen "A" und "B" so fest fixiert, daß die Aldehyd-Gruppe nicht mehr in die Region "D" reicht.

Im Falle des 2, 4, 5-Trimethoxybenzaldehyds, der im Gegensatz zum symmetrischen 3, 4, 5-Trimethoxybenzaldehyd durch die AR nicht reduziert wird, kann außerdem eine sterische Behinderung der Wasserstoffübertragung diskutiert werden:

1. Die Methoxygruppe in Position 2 ist so eng benachbart zur Aldehyd-Gruppe, daß ein Wasserstoff-Transfer aus räumlichen Gründen unmöglich ist.
2. Die Anpassung des Moleküls an die Region "B" und "C" ist so gestört, daß eine enzymatische Reduktion nicht mehr stattfinden kann.

Diese Vorstellungen sind auch mit dem Befund vereinbart, daß die aromatische, ungesättigte Ketosäure 4-(3, 4-Dimethoxyphenyl)-2-oxo-3-butensäure ein Substrat für die AR sein kann, sofern die räumliche Ausdehnung der Region "D" eine Annäherung der Ketogruppe an den Nicotinamidrest des NADPH zuläßt. Gegenüber den Benzaldehyden kleinere high- und low- k_m -Werte (0,093 und 0,64 μM) sprechen für eine gute Affinität dieser Verbindung zur Aldehyd-Reduktase. Es ist denkbar, daß die Doppelbindung in Nachbarschaft zur Ketogruppe eine Elektronenkonfiguration bedingt, die die Reduktion begünstigt.

Bei der zweiten aromatischen Ketosäure 4-(3, 4-Dimethoxyphenyl)-4-oxo-buttersäure mit einer aliphatischen Seitenkette von 4 C-Atomen, die um ihre Achsen frei drehbar sind, ist eine sterische Behinderung der Reduktion zu vermuten. Die Verbindung ist ein Inhibitor mit einer Hemmkonstanten von 0,11 μM .

In Arbeiten mit der AR verschiedener Spezies und Organe, u. a. auch der Nierenrinde, wird die Reduktion der Ketone 4-Nitroacetophenon, Benzylmethylketon, Cyclohexanon und Campherchinon beschrieben (8, 14, 54). TURNER und TIPTON konnten mit Schweinehirnenzym keinen Umsatz für die Ketone Aceton, Pyruvat, p-OH-phenylpyruvat, 4-Nitroacetophenon und

Cyclohexanon finden (68).

Auch wenn eine Ketoverbindung Substrat der AR sein kann, besitzt die NADPH-abhängige Aldehyd-Reduktase des Gehirns doch eine hohe Substratspezifität für Aldehyde, wobei bevorzugt aromatische Aldehyde, speziell Phenylglycolaldehyde umgesetzt werden.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Die NADPH-abhängige Aldehyd-Reduktase (AR) des Gehirns katalysiert den reduktiven Endschrift im Abbau der biogenen Amine zu den biogenen Alkoholen.

Die vorliegende Arbeit beschreibt mit teilgereinigten Enzympräparationen aus Rindergehirn in der AR-Reaktion erhaltene Aldehyd-Substrat- und Inhibitoreigenschaften verschiedener Hydroxy- und Methoxy-substituierter Benzaldehyde und zweier aromatischer Ketosäuren im Vergleich mit dem Standardsubstrat 4-Nitrobenzaldehyd.

1. Substrate der AR sind drei stereoisomere Dimethoxy-Benzaldehyde und der symmetrische 3, 4, 5-Trimethoxy-Benzaldehyd (k_m -Werte: 5, 9 - 130 μM).

Die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten bei 28 μM NADPH liegen zwischen 0,6 und 2,1 nMol NADPH/min·mg Protein. Die unsymmetrischen Trimethoxy-BA werden nicht als Substrate akzeptiert.

Die zwei stereoisomeren Dihydroxy-Benzaldehyde erwiesen sich als Inhibitoren der AR-Reaktion (k_i -Werte: 12 - 23 μM). Der Einfluß der Substituenten am Benzolring der aromatischen Aldehyde wird diskutiert.

Die ungesättigte Ketosäure 4-(3, 4-Dimethoxyphenyl)-2-oxo-3-buten-säure ist ein Substrat (k_m -Werte: 0,093 bzw. 0,64 μM), die 4-(3, 4-Dimethoxyphenyl)-4-oxo-buttersäure ist ein Hemmstoff (k_i -Wert: 0,1 mM).

Die Aldehyd-Reduktase aus Rindergehirn scheint eine hohe Spezifität für Aldehyde zu besitzen.

2. Die AR des Rindergehirns besteht wahrscheinlich aus mindestens zwei Isoenzymen, für deren Substrate high- und low- k_m -Werte ermittelt werden können. Das Hemmverhalten ist gemischt, alle Inhibitoren beeinflussen die AR-Reaktion unkompetitiv und bei höheren Substrat- und Inhibitorkonzentrationen nicht-kompetitiv.
3. Der Ablauf der AR-Reaktion folgt einer ungeordneten Bindung der Substrate an ein aktives Zentrum zum Enzym-Substrat-Substrat-Komplex nach dem random-order-Mechanismus.

Die Michaelis-Konstanten für das Standardsubstrat 4-NBA und das Coenzym NADPH sind $55 \mu\text{M}$ bzw. $2,8 \mu\text{M}$ ($\text{high-}k_m\text{-AR}$).

Die maximalen Umsatzgeschwindigkeiten der Standardreaktion betragen $9,62 \text{ nMol NADPH/min} \cdot \text{mg Protein}$ bei $28 \mu\text{M}$ NADPH.

Die Bedeutung der Existenz von AR-Isoenzymen und die Inhibition der AR-Reaktion durch Hypnotika und Antikonvulsiva als Erklärungsmöglichkeit der Wirkungsweise dieser Pharmaka wird diskutiert.

(Freiseite)

F. ANHANG:

Tabellen 1 - 14

Tabelle 1 : Ergebnisse einer Proteinbestimmung am Beispiel der 3. Enzympräparation (vgl. Eichkurve Abb. 5)

ml der verdünnten Enzymlösung	im Verdünnungs- verhältnis von:	E _{750 nm}	µg Protein ml verdünnte Meßansatz- lösung	mg Protein ml Enzymlösung
0.25		162	17.8	35.6
0.50	1 : 50	240	31.6	31.6
1.00		346	-	-
0.25		102	9.4	37.6
0.50	1 : 100	167	18.6	37.2
1.00		249	33.4	33.4
0.25		54	-	-
0.50	1 : 200	97	-	-
1.00		158	17.3	34.6

Tabelle 2 : Zusammenstellung der Enzympräparationen, ihre Protein-
konzentrationen, sowie der spezifischen Aktivitäten
(vgl. Tab. 1 und Abb. 8)

Enzympräparation Nr.	1	2	3	4
Hirngewichte in g	305 522	400	350 430	358 274
ml Enzymlösung nach Dialyse	47, 0	22, 0	36, 0	32, 5
mg Protein/ml Enzym- lösung (lt. Proteinbestimmung)	22, 5 $\pm$ 1, 4	26, 0 $\pm$ 4, 5	35, 0 $\pm$ 2, 3	27, 0 $\pm$ 1, 9
mg Protein/ml Meß- ansatz in der Meßküvette	0, 75 $\pm$ 0, 05	0, 86 $\pm$ 0, 15	1, 16 $\pm$ 0, 08	0, 9 $\pm$ 0, 06
erreichter absoluter NADPH-Umsatz (nMol/min)	4, 50	4, 40	5, 05	4, 90
spezifische Aktivität (nMol/min·mg Protein)	6, 0	5, 11	4, 35	5, 44

aufsteigende Substrat-
konzentrationsreihe

Vergleichsreaktionsreihe $\bullet \longrightarrow \bullet$
ohne Inhibitorzusatz
(siehe Abb. 25 A)

4-NBA- Stlg. (in ml) ad 3 ml Meßkü- vetten- inhalt	[S] $\times 10^{-4} M$	$\frac{1}{[S]}$ $(mM)^{-1}$	ΔE_{340} in 3, 33 Min.	ΔE_{340} in 1, 0 Min.	v $(\frac{nMol}{ml \cdot Min.})$	$\frac{1}{v \times 10^{-5}}$ (M/Min.)
0, 015	0, 19	52, 63	39	11, 71	1, 88	5, 31
0, 020	0, 26	38, 46	45	13, 51	2, 17	4, 60
0, 025	0, 32	31, 25	56	16, 81	2, 70	3, 70
0, 030	0, 39	26, 64	61	18, 31	2, 94	3, 40
0, 035	0, 43	23, 25	62, 5	18, 77	3, 01	3, 32
0, 040	0, 52	19, 23	74	22, 22	3, 57	2, 80
0, 045	0, 58	17, 24	79, 5	23, 87	3, 83	2, 61
0, 050	0, 65	15, 38	82	24, 62	3, 95	2, 53
0, 055	0, 71	14, 08	88	26, 42	4, 24	2, 35
0, 060	0, 78	12, 82	89	26, 72	4, 29	2, 33
0, 065	0, 84	11, 90	94	28, 22	4, 53	2, 20
0, 070	0, 90	11, 11	93, 5	28, 07	4, 51	2, 21
0, 075	0, 97	10, 30	96	28, 82	4, 63	2, 15
0, 080	1, 04	9, 61	101	30, 33	4, 87	2, 05
0, 090	1, 17	8, 54	103, 5	31, 08	4, 99	2, 00
0, 10	1, 30	7, 68	107	32, 13	5, 16	1, 93
0, 12	1, 56	6, 41	111	33, 33	5, 35	1, 86

Tabelle 3 : Ein Beispiel der Berechnung der Daten zur graphischen
Auswertung aus den Meßergebnissen.

(vgl. Abb. 25 A - C --- Inhibitor: 2, 4-Dihydroxybenz-
aldehyd)

gehemmte Reaktionsreihe $\square \text{---} \square$ mit
(siehe Abb. 25 A - C)

$$[I] = 2,73 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$\pm 0,01 \text{ ml}$ der Inhibitor-
stlsg. ad 3 ml Mk

ΔE_{340} in 3, 33 Min.	ΔE_{340} in 1, 0 Min.	v_i ($\frac{n \text{ Mol}}{\text{ml} \cdot \text{Min.}}$)	$\frac{1}{v_i \times 10^{-5}}$ (M/Min.)	$[I] \cdot \frac{v_i}{v - v_i}$ (μM)
25	7,50	1,20	8,33	41,71
30	9,00	1,44	6,94	46,69
33	9,90	1,59	6,28	33,89
33	9,90	1,59	6,28	27,73
36,5	10,96	1,76	5,68	33,18
38	11,41	1,83	5,46	24,88
36	10,81	1,73	5,78	22,27
38,5	11,56	1,85	5,40	22,04
40	12,01	1,93	5,18	22,51
42	12,61	2,02	4,95	21,56
44,5	13,36	2,14	4,67	23,64
--	--	--	--	--
46	13,81	2,22	4,50	22,99
48	14,41	2,31	4,32	23,46
47	14,11	2,26	4,42	20,38
49	14,71	2,36	4,23	21,09
51,5	15,46	2,48	4,03	21,80
56	16,81	2,70	3,70	23,93

Konstante Reaktionspartner in der Meßküvette:

NADPH : $2,8 \pm 0,1 \times 10^{-5} \text{ M}$

Enzymprotein : $0,75 \pm 0,09 \text{ mg/ml}$

4-NBA-Stammlösung : $2,95 \text{ mg/0,5 ml Methanol}$
+ $4,5 \text{ ml Phosphat-Puffer (0,1 M/ pH 7,0)}$

Inhibitor-Stammlösung: $2,95 \text{ mg/0,5 ml Methanol}$
+ $2,5 \text{ ml Phosphat-Puffer (w.o.)}$

Tabelle 4 : Die eingesetzten Inhibitorkonzentrationen zur Ermittlung der halbmaximalen Reaktionsgeschwindigkeit

Testsubstanz	in der Standard- reaktion eingesetzte Inhibitorkonzentrationen in M	mittlere Extinktions- differenz ΔE der Standardreaktion (*) n = Anzahl der Messungen
3, 4-Dimethoxy- benzaldehyd	$1 \cdot 10^{-6} - 4 \cdot 10^{-3}$	96 n = 15
2, 3-Dimethoxy- benzaldehyd	$1 \cdot 10^{-6} - 4 \cdot 10^{-3}$	90 n = 25
3, 5-Dimethoxy- benzaldehyd	$2 \cdot 10^{-6} - 2,4 \cdot 10^{-3}$	90 n = 25
3, 4, 5-Trimethoxy- benzaldehyd	$8,5 \cdot 10^{-7} - 3,6 \cdot 10^{-3}$	90 n = 25
2, 3, 4-Trimethoxy- benzaldehyd	$8,3 \cdot 10^{-7} - 9,9 \cdot 10^{-3}$	90 n = 25
2, 4, 5-Trimethoxy- benzaldehyd	$8,3 \cdot 10^{-7} - 5,0 \cdot 10^{-4}$	90 n = 25
4-(3, 4-Dimethoxy- phenyl)-2-oxo- butensäure	$1,4 \cdot 10^{-6} - 1,7 \cdot 10^{-4}$	96 n = 15

(*) Diese Extinktionsdifferenzen wurden als 100 % Enzym-Aktivität gewertet.

Tabelle 5 : Auswertung des Lineweaver-Burk-Diagrammes (vgl. Abb. 11) mit dem variablen Substrat NADPH (nur high- k_m -Reduktase)

[4-NBA] $\times 10^{-5}$ M	[S] $\times 10^{-5}$ M	k_m -Wert $\times 10^{-6}$ M	* $1/v_{\max}$ $\left(\frac{\text{nMol}}{\text{min. mg Prot.}} \right)^{-1}$	$v_{\max}$ $\left(\frac{\text{nMol}}{\text{min. mg Prot.}} \right)$	* Steigung $\times 10^{-3}$ $\left(\frac{\text{nMol}}{\text{min. mg Protein}} \right)^{-1}$	(mM)
5.9	1.0 - 5.0	2.7	0.198	5.04	0.37	
7.2	1.0 - 5.0	2.8	0.170	5.86	0.32	
9.3	1.0 - 5.0	2.9	0.154	6.47	0.28	
13.0	1.0 - 5.0	2.7	0.135	7.39	0.25	
21.7	1.0 - 5.0	2.9	0.122	8.17	0.23	

Enzymprotein in der Mk: 0.75 mg/ml

* diese Daten wurden zur Erstellung der Sekundärdiagramme nach Dalziel (Abb. 9 A/B) herangezogen

Tabelle 6 : Auswertung des Lineweaver-Burk-Diagrammes (vgl. Abb. 4 und 12) mit dem variablen Substrat 4-Nitrobenzaldehyd (nur high- k_m -Reduktase)

[NADPH] $\times 10^{-5}$ M	[S] $\times 10^{-5}$ M	k_m -Wert $\times 10^{-5}$ M	$\frac{1}{v_{\max}}^*$ $\left(\frac{\text{nMol}}{\text{min} \cdot \text{mg Prot.}}\right)^{-1}$	$v_{\max}$ $\left(\frac{\text{nMol}}{\text{min} \cdot \text{mg Prot.}}\right)$	$\frac{*}{\text{Steigung} \times 10^{-3}}$ $(\text{nMol/min} \cdot \text{mg Prot.})^{-1} \text{ (mM)}$
1.5	2.6-19.5	5.4	0.110	9.0	4.29
2.5	2.6-15.6	5.2	0.105	9.5	4.05
2.80 ^x	1.9-15.6	5.9	0.099	10.1	3.90
2.86 ^{xx}	2.6-19.5	5.5	0.103	9.6	4.0
3.5	2.6-15.6	5.5	0.092	10.7	3.6
5.0	2.6-13.0	5.6	0.081	12.2	3.21

Enzymprotein in der Mk: 0.75 mg/ml

^x ungehemmte Vergleichsreihe aus Abb. 25 A

^{xx} aus Gründen der graphischen Übersichtlichkeit nicht in Abb. 12 sondern in Abb. 4 dargestellt.

* diese Daten wurden zur Erstellung der Sekundärdiagramme nach Dalziel (Abb. 9 A/B) herangezogen

Tabelle 7 : Auswertung des Lineweaver-Burk-Diagrammes (vgl. Abb. 14) mit dem variablen Substrat 3, 4-Dimethoxybenzaldehyd (Veratrumaldehyd)

[NADPH] $\times 10^{-5}$ M	[S] $\times 10^{-4}$ M	k_m -Wert $\times 10^{-5}$ M	$1/v_{\max}$ $\left(\frac{n\text{Mol}}{\text{min} \cdot \text{mg Prot.}} \right)^{-1}$	$v_{\max}$ $\left(\frac{n\text{Mol}}{\text{min} \cdot \text{mg Prot.}} \right)$	% des NADPH- Umsatzes mit 4-NBA als Substrat
"high-k" m	2.8	1.0 - 16.0	1.62	0.61	6, 4
	4.1	0.8 - 12.0	1.38	0.72	-
	5.9	0.8 - 8.0	0.92	1.08	-
"low-k" m	2.8	0.16- 1.0	3.33	0.30	-
	4.1	0.16- 1.0	3.03	0.33	-
	5.9	0.16- 1.0	1.92	0.52	-

Proteine: 0,9 mg/ml Mk

Tabelle 8 : Auswertung des Lineweaver-Burk-Diagrammes mit dem variablen Substrat 2, 3-Dimethoxybenzaldehyd (vgl. Abb. 15)

[NADPH] $\times 10^{-5}$ M	[S] $\times 10^{-4}$ M	k_m -Wert $\times 10^{-5}$ M	$1/v_{\max}$ $\left(\frac{\text{nMol}}{\text{min} \cdot \text{mg Prot.}} \right)^{-1}$	$v_{\max}$ $\left(\frac{\text{nMol}}{\text{min} \cdot \text{mg Prot.}} \right)$	% des NADPH- Umsatzes mit 4-NBA als Substrat	mg Protein ml Meßansatz
"high-k"						
0.5	1.0 - 9.0	18.6	1.20	0.83	-	0.75
1.0	0.9 - 9.0	17.4	0.90	1.11	-	0.86
2.7	1.5 - 7.5	18.2	0.66	1.50	15, 6	0.86
5.3	1.5 - 6.0	17.9	0.59	1.68	-	0.86
"low-k"						
0.5	0.4 - 2.0	1.85	2.77	0.36	-	0.75
1.0	0.3 - 0.9	2.06	2.70	0.37	-	0.86
2.7	0.3 - 0.9	2.21	1.38	0.72	-	0.86
5.3	0.3 - 0.9	2.23	1.23	0.81	-	0.86

Tabelle 9 : Auswertung des Lineweaver-Burk-Diagrammes mit dem variablen Substrat 3, 5-Dimethoxybenzaldehyd (vgl. Abb. 16)

	[NADPH] $\times 10^{-5}$ M	[S] $\times 10^{-4}$ M	k_m -Wert $\times 10^{-5}$ M	$1/v_{\max}$ $\left(\frac{\text{nMol}}{\text{min. mg Prot.}} \right)^{-1}$	$v_{\max}$ $\left(\frac{\text{nMol}}{\text{min. mg Prot.}} \right)$	% des NADPH-Umsatzes mit 4-NBA als Substrat	mg Protein ml Meßansatz
"high- k_m -Reduktase"	1.1	1.0 - 8.0	8.19	0.49	2.03	-	0.86
	2.6	keine Auswertung, da zu große Streuung der Werte					
	2.7	1.0 - 8.0	8.32	0.47	2.12	22.0	0.75
	4.2	keine Auswertung, da zu große Streuung der Werte					
	6.8	2.0 - 10.0	8.31	0.45	2.22	-	0.86
"low- k_m -Reduktase"	1.1	0.5 - 2.0	1.67	0.78	1.28	-	0.86
	2.6	0.5 - 2.0	1.68	0.72	1.38	-	0.86
	2.7	keine Auswertung, da zu große Streuung der Werte					
	4.2	0.5 - 2.0	1.70	0.62	1.59	-	0.86
	6.8 ^x	0.5 - 2.0	1.77	0.61	1.63	-	0.86

^x aus Gründen der graphischen Übersichtlichkeit in Abb. 16 A nicht dargestellt

Tabelle 10 : Auswertung des Lineweaver-Burk-Diagrammes mit dem variablen Substrat 3, 4, 5-Trimethoxybenzaldehyd (vgl. Abb. 18)

	[NADPH] x 10 ⁻⁵ M	[S] x 10 ⁻⁴ M	k _m - Wert 10 ⁻⁴ M	1/v _{max} ($\frac{\text{nMol}}{\text{min} \cdot \text{mg Prot.}}$) ⁻¹	v _{max} ($\frac{\text{nMol}}{\text{min} \cdot \text{mg Prot.}}$)	% des NADPH- Umsatzes mit 4-NBA als Substrat
"high-k _m " Reduktase	1,2	3,4 - 15,8	1,93	1,96	0,51	-
	2,7	3,4 - 17,0	1,81	1,51	0,66	6,8
	5,9	3,4 - 15,8	1,59	1,33	0,75	-
"low-k _m " Reduktase	1,2	0,5 - 3,4	5,28	2,63	0,38	-
	2,7	0,5 - 3,4	5,03	1,92	0,52	-
	5,9	0,5 - 3,4	5,27	1,58	0,63	-

Proteine : 1,16 mg/ml Mk

Tabelle 11 : Auswertung des Lineweaver-Burk-Diagrammes mit dem variablen

Substrat 4-(3, 4-Dimethoxyphenyl)-2-oxo-3-butensäure (vgl. Abb. 20 A/B)

[NADPH] $\times 10^{-5}$ M	[S] μ M	k_m -Wert $\times 10^{-7}$ M	$1/v_{\max}$ $\left(\frac{n\text{Mol}}{\text{min} \cdot \text{mg Prot.}} \right)^{-1}$	$v_{\max}$ $\left(\frac{n\text{Mol}}{\text{min} \cdot \text{mg Prot.}} \right)$	% des NADPH- Umsatzes mit 4-NBA als Substrat
0.3	0.2 - 7.0	6.50	0.69	1.44	-
1.2 ^x	0.4 - 14.1	6.42	0.65	1.52	-
3.0	0.5 - 28.2	6.24	0.63	1.59	16.5
0.3	0.1 - 0.4	0.94	1.61	0.62	-
1.2	0.1 - 0.7	0.95	1.40	0.71	-
3.0	keine Auswertung, da zu große Streuung der Meßwerte				
6.0	0.1 - 0.7	0.88	1.21	0.82	-

^x aus Gründen der graphischen Übersichtlichkeit in der Abb. 20 A nicht dargestellt

Proteine: 1.16 mg/ml Mk

Tabelle 12 : k_i -Wert-Ermittlung für 2, 4-Dihydroxybenzaldehyd (vgl. Abb. 25 A-C)

konst. Inhibitor-Konzentration	k_m -Wert f. 4-NBA	$[S] = [4-NBA]$	k_i -Wert nach H-D	k_i -Wert nach H-D	k_i -Wert nach Dixon	konst. $[S] = [4-NBA]$	$[I]$
$[I]$ (μM)	nichtkomp. Hemmtyp ($\times 10^{-5}$ M)		unkomp. Hemmtyp ($\times 10^{-5}$ M)	nichtkompetitiver Hemmtyp ($\times 10^{-5}$ M)			
1.18	6.56	4.3-15.6	-	0.50	2.78	6.5	0.118 - 7.11
2.37	6.27	3.9-15.6	-	0.58	2.79	7.1	0.118 - 7.11
11.8	5.64	4.3-13.0	1.84	-	2.66	9.0	0.118 - 7.11
23.7	5.30	5.2-15.6	2.23	-	2.62	10.4	0.118 - 7.11
35.5	5.38	4.3-13.0	2.16	-	2.54	13.0	0.118 - 7.11
47.4	5.94	6.5-13.0	1.97	-			
71.1	4.95	6.5-13.0	2.11	-			
$k_{m/i}$ -Mittelwerte:	5.72		2.06	0.54	2.67		

$[NADPH] : 2.8 \times 10^{-5}$ M

Enzymproteine: 0.75 mg/ml Mk

Tabelle 13 : k_i -Wert-Ermittlung für 3, 4-Dihydroxybenzaldehyd (vgl. Abb. 26 A-C)

konst. Inhibitor- konzentration [I] (μ M)	k_m -Wert f. 4-NBA [4-NBA]	[S] =	k_i -Wert nach H-D	k_i -Wert nach H-D	k_i -Wert nach Dixon	konst. [S] =	[I]
	nichtkomp. Hemmtyp ($\times 10^{-5}$ M)	nichtkomp. Hemmtyp ($\times 10^{-5}$ M)	unkomp. Hemm- typ ($\times 10^{-5}$ M)	nichtkompetitiver Hemmtyp ($\times 10^{-5}$ M)			
1.18	6.28	4.3-15.6	-	0.48	1.11	7.8	0.118 - 4.74
2.37	6.23 ^x	4.3-15.6	-	0.67	1.21	10.4	0.118 - 4.74
5.92	5.89	4.3-15.6	1.06	-	1.17	11.7	0.118 - 4.74
11.8	6.12	4.3-15.6	1.20	-	1.08	15.6	0.118 - 4.74
27.3	6.23	5.2-15.6	1.57	-			
35.5	5.33	6.5-15.6	1.40	-			
47.4	5.73	7.8-15.6	1.04	-			
$k_{m/i}$ -Mittel- werte:	5.97		1.24	0.57	1.14		

[NADPH] : $2.7 \cdot 10^{-5}$ M

Enzymproteine: 0.75 mg/ml Mk

^x aus Gründen der graphischen Übersichtlichkeit ist diese Reihe in Abb. 26 A nicht dargestellt.

Tabelle 14 : k_i -Wert-Ermittlung für 4-(3, 4-Dimethoxyphenyl)-4-oxo-buttersäure (vgl. Abb. 27 A-D)

konst. Inhibitor- Konzentration [I] ($\times 10^{-5}$ M)	k_m -Wert f. 4-NBA [4-NBA]	[S] = [4-NBA]	k_i -Wert nach H-D	k_i -Wert nach H-D	k_i -Wert nach Dixon	konst [S] = [4-NBA]	[I]
	nichtkomp. Hemmtyp ($\times 10^{-5}$ M)	unkomp. Hemm- typ ($\times 10^{-5}$ M)	nichtkompetitiver Hemmtyp ($\times 10^{-5}$ M)				
1.0	5.29	6.5-15.6	8.46	-	11.4	7.8	1.0 - 15.5
3.1	5.37	6.5-15.6	8.92	-	11.3	9.0	1.0 - 15.5
5.1	5.09	6.5-15.6	9.44	-	11.1	11.7	1.0 - 15.5
7.2	5.36	6.5-15.6	9.25	-	11.1	13.0	1.0 - 10.3
10.3	5.24	6.5-15.6	9.79	-			
15.5	5.05	6.5-15.6	10.30	-			
$k_{m/i}$ -Mittel- werte:	5.23		9.36		11.2		

[NADPH] : $2.6 \pm 0.2 \cdot 10^{-5}$ M

Enzymproteine: 0.75 mg/ml Mk

G. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

AR	:	Aldehyd-Reduktase
NADP(H)	:	Nicotinamiddinucleotidphosphat (reduzierte Form)
4-NBA	:	4-Nitrobenzaldehyd
(DM)BA	:	Dimethoxy-Benzaldehyd
EDTA	:	Äthylendinitrilotetraessigsäure
(m)M	:	(milli)molar
nm	:	Nanometer
ΔE	:	die Differenz zweier Extinktionseinheiten
v	:	Reaktionsgeschwindigkeit
v_i	:	Reaktionsgeschwindigkeit in Gegenwart eines Inhibitors
$v_{\max}$	:	Sättigungsgeschwindigkeit
[S]	:	Substratkonzentration
[I]	:	Inhibitorkonzentration
k_m	:	Michaeliskonstante eines Substrates
k_i	:	Hemmkonstante eines Inhibitors
IC_{50}	:	Inhibitorkonzentration zur halbmaximalen Reaktionshemmung
Stlsg.	:	Stammlösung
Mk	:	Meßküvette
H-D	:	Hunter und Downs
S. D.	:	Standardabweichung

H. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) APPEL, S.H., B.L. PARROT: Hexose Monophosphate Pathway in Synapses.
J. Neurochem. 17, 1619-1626 (1970)
- 2) AXELROD, J.: The Metabolic Storage and Release of Catecholamines.
Recent Progr. Hormone Res. 21, 597-622 (1965)
- 3) BAROFSKI, I., A. FELDSTEIN: Serotonin and its Metabolites: their Respective Roles in the Production of Hyperthermia in the Mouse.
Experientia 26, 990-991 (1970)
- 4) BARONDES, S.H.: The Influence of Neuroamines on the Oxidation of Glucose by the Anterior Pituitary. I. The Role of Monoamine Oxidase.
J. Biol. Chem. 237, 204-207 (1962)
- 5) BLAIR, A.H., F.H. BODLEY: Human Liver Aldehyde Dehydrogenase: Partial Purification and Properties.
Can. J. Biochem. 47, 265-271 (1969)
- 6) BLASHKO, H., D. RICHTER und H. SCHLOSSMANN: The Oxidation of Adrenaline and other Amines.
Biochem. J. 31, 2187-2196 (1937)
- 7) BLASHKO, H.: Amine Oxidase and Amine Metabolism.
Pharmacol. Rev. 4, 415-458 (1952)
- 8) BOSRON, W.F., R.L. PRAIRIE: a) Triphosphopyridine Nucleotide-linked Aldehyde Reduktase.
J. Biol. Chem. 247, 4480-4485 (1972)
b) Reduced Triphosphopyridine-linked Aldehyd-Reduktase - II. Species and Tissue Distribution.
Arch. Biochem. Biophys. 154, 166-172 (1973)

- 9) BREESE, G. R., T. N. CHASE und I. J. KOPIN: a) Metabolism of Tyramine- H^3 and Octopamin- H^3 by Rat Brain.
Biochem. Pharmacol. 18, 863-869 (1969)
b) Metabolism of some Phenylethylamines and their β -Hydroxylated-Analoges in Brain.
J. Pharmacol. exp. Ther. 165, 9-13 (1969)
- 10) BRONAUGH, R. L., V. G. ERWIN: Further Characterization of a Reduced Nicotinamide-Adenine Dinucleotide Phosphate-Dependent Aldehyd-Reduktase from Bovine Brain-Inhibition by Phenothiazine Derivates.
Biochem. Pharmacol. 21, 1457-1464 (1972)
- 11) BRONAUGH, R. L., V. G. ERWIN: Partial Purification and Characterization of NADPH-linked Aldehyd-Reduktase from Monkey Brain.
J. Neurochem. 21, 809-815 (1973)
- 12) CARLSON, A., N. A. HILLARP: Formation of Phenolic Acids in Brain after Administration of 3,4-Dihydroxyphenylalanine.
Acta Physiolog. Scand. 55, 95-100 (1962)
- 13) CHRIST, W.: unveröffentlichte, persönliche Mitteilung (1971)
- 14) CULP, H. W., R. E. McMAHON: Reduktase for Aromatic Aldehydes and Ketones.
J. Biol. Chem. 243, 848-52 (1968)
- 15) DALZIEL, K.: Initial Steady State Velocities in the Evaluation of Enzyme-Coenzyme-Substrate Reaction Mechanisms.
Acta Chem. Scand. 11, 1706-1723 (1957)
- 16) DAVIS, V. E., A. C. COLLINS, J. L. CASHAW und B. R. McLAUGHLIN: Barbiturate-induced Modifications of Norepinephrine Metabolism.
Trans. Am. Soc. Neurochem. 3, 68 (1972)

- 17) DEITRICH, R. A., L. HELLERMANN und J. WEIN: Diphosphopyridine Nucleotide-linked Aldehyde Dehydrogenase. Specificity and Sigma-rho function.
J. Biol. Chem. 237, 560-564 (1962)
- 18) DEITRICH, R. A.: Tissue and Subcellular Distribution of mammalian Aldehyde-oxidizing Capacity.
Biochem. Pharmacol. 15, 1911-1912 (1966)
- 19) DIXON, M.: The Determination of Enzyme Inhibitor Constants.
Biochem. J. 55, 170-171 (1953)
- 20) DUNCAN, R. S. J., K. F. TIPTON: a) The Purification and Properties of the NAD-linked Aldehyd-Dehydrogenase from Pig Brain.
Eur. J. Biochem. 22, 257-262 (1971)
b) The Kinetics of Pig Brain Aldehyd-Dehydrogenase.
Eur. J. Biochem. 22, 538-543 (1971)
- 21) ECCLESTON, D., A. T. B. MOIR, H. W. READING und I. M. RITCHIE: The Formation of 5-Hydroxytryptophol in Brain in vitro.
Brit. J. Pharmacol. Chemother. 28, 367-377 (1969)
- 22) ERWIN, V. G., R. A. DEITRICH: Brain Aldehyde Dehydrogenase. Localization, Purification, and Properties.
J. Biol. Chem. 241, 3533-3539 (1966)
- 23) ERWIN, V. G., B. TABAKOFF und R. L. BRONAUGH: Inhibition of a Reduced Nicotinamide-Adenine Dinucleotide Phosphate-linked Aldehyd-Reduktase from Bovine Brain by Barbiturates.
Molec. Pharmacol. 7, 169-176 (1971)
- 24) ERWIN, V. G., W. D. W. HESTON und B. TABAKOFF: Purification and Characterization of an NADH-linked Aldehyde Reduktase from Bovine Brain.
J. Neurochem. 19, 2269-2278 (1972)

- 25) ERWIN, V.G., R.A. DEITRICH: Inhibition of Bovine Brain Aldehyde-Reduktase by Anticonvulsant Compounds in vitro.
Biochem. Pharmacol. 22, 2615-2624 (1973)
- 26) FOLIN, O., V. CIOCALTEU: On Tyrosine and Tryptophane Determinations in Proteins.
J. Biol. Chem. 73, 627-653 (1927)
- 27) FREDA, C.E., A.O.M. STOPPANI: Kinetics of Bovine Liver Aldehyde Dehydrogenase. Effect of Coenzyme and Aldehyde Structure.
Enzymologia 38, 225-242 (1970)
- 28) GESSNER, P.K., A.G. SOBLE: A Study of the Tranlycypromine-Meperidine Interaction: Effects of p-Chlorophenylalanine and 1-5-Hydroxytryptophan.
J. Pharmac. exp. Ther. 186, 276-287 (1973)
- 29) GLOWINSKI, J., I.J. KOPIN und J. AXELROD: Metabolism of ^3H -Norepinephrine in the Rat Brain.
J. Neurochem. 12, 25-30 (1965)
- 30) GOLDSTEIN, M., A.J. FRIEDHOFF, S. POMERANTZ und J.F. CONTRERA: The Formation of 3, 4-Dihydroxyphenylethanol and 3-Methoxy-4-Hydroxyphenylethanol from 3, 4-Dihydroxyphenylethylamine in the Rat.
J. Biol. Chem. 236, 1816-1821 (1961)
- 31) GOLDSTEIN, M., H. GERBER: Phenolic Alcohols in the Brain after Administration of DOPA- C^{14} or Dopamin- C^{14} .
Life Sci. 2, 97-100 (1963)
- 32) GULDBERG, H.C., CH.A. MARSDEN: Catechol-O-Methyl-Transferase: Pharmacological Aspekts and Physiological Role.
Pharmacol. Rev. 27, 2, 135-306 (1975)

- 33) HESTON, W.D.W., V.G. ERWIN: Bovine Brain Alcohol Dehydroxy-
genase: Partial Purification and Characterization.
Trans. Am. Soc. Neurochem. 3, Abstr. 87 (1972)
- 34) HUNTER, A., C.E. DOWNS: The Inhibition of Arginase by Amino
Acids.
J. Biol. Chem. 157, 427-446 (1945)
- 35) JOUVET, M.: Biogenic Amines and the States of Sleep.
Science 163, 32-41 (1969)
- 36) O'KEEFEE, R., D.F. SHARMAN und M.O. VOGT: Effect of Drugs
used in Psychoses on cerebral Dopamine Metabolism.
Br. J. Pharmacol. Chemother. 38, 287-304 (1970)
- 37) KOPIN, I.J., J. AXELROD und E. GORDON: The Metabolic Fate of
 H^3 -Epinephrine and C^{14} -Metanephrine in the Rat.
J. Biol. Chem. 236, 2109-2113 (1961)
- 38) KOPIN, I.J.: Biochemical Aspects of Release of Norepinephrine and
other Amines from Sympathetic Nerve Endings.
Pharmacol. Rev. 18, 513-523 (1966)
- 39) KRIVCHENKOVA, R.S.: The Effect of Deamination Products of some
Biogenic Amines on the Activity of Cytochrome Oxidase.
Biokhimiya 39, 79-85 (1974)
- 40) LEYDEN WEBB, J.: Enzyme and Metabolic Inhibitors. Vol. I. General
Principles of Inhibition.
Academic Press, New York and London (1963)
- 41) LINEWEAVER, H., D. BURK: The Determination of Enzyme
Dissociation Constants.
J. Am. Chem. Soc. 56, 658-666 (1934)
- 42) LOWRY, H.O., N.I. ROSEBROUGH, A.L. FARR und R.J. RENDALL:
Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

- 43) LUMPER, L.: Grundlagen der Kinetik enzymatisch katalysierter Reaktionen, in Hoppe-Seyler/Thierfelder "Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch-Chemischen Analyse". 10. Auflage, 6. Band, Teil A. 17-55. Springer Verlag, Berlin (1964)
- 44) MAAS, J.W., D.H. LANDIS: In Vivo Studies of the Metabolism of Norepinephrine in the Central Nervous System. J. Pharmac. exp. Ther. 163, 147-162 (1968)
- 45) MAXWELL, E.S., Y.J. TOPPER: Steroid-sensitive Aldehyde-Dehydrogenase from Rabbit Liver. J. Biol. 236, 1032-1037 (1961)
- 46) MICHAELIS, L., M.L. MENTEN: Die Kinetik der Invertinwirkung. Biochem. Z. 49, 333-369 (1913)
- 47) MOLINOFF, P.B., J. AXELROD: Biochemistry of Catecholamines. Am. Rev. Biochem. 40, 465-500 (1971)
- 48) MOSER, K., J. PAPENBERG, J.P. VON WARTBURG: Heterogenität und Organverteilung der Alkoholdehydrogenase bei verschiedenen Spezies. Enzymol. Biol. Clin. 9, 447-458 (1968)
- 49) NEFF, N.H., H.-Y. T. YANG: Another Look at the Monoamineoxidase and the Monoamine Oxidase Inhibitor Drugs. Life Sci. 14, 2061-74 (1974)
- 50) NYBÄCK, H., G. SEDVALL: Further Studies on the Accumulation and Disappearance of the Catecholamines formed from Tyrosine-¹⁴C in Mouse Brain. Effect of some Phenothiazine Analogues. Eur. J. Pharmacol. 10, 193-205 (1970)

- 51) RACKER, E.: Aldehyde-Dehydrogenase, a Diphosphopyridine Nucleotide-linked Enzyme.
J. Biol. Chem. 177, 883-893 (1949)
- 52) RASKIN, N.H., L. SOKOLOFF: Brain Alkohol-Dehydrogenase.
Science 162, 131-132 (1968)
- 53) RASKIN, N.H., L. SOKOLOFF: Alcohol Dehydrogenase Activity in Rat Brain and Liver.
J. Neurochem. 17, 1677-1687 (1970)
- 54) RIS, M.M., J.P. VON WARTBURG: Heterogeneity of NADPH - Dependent Aldehyd-Reduktase from Human and Rat Brain.
Eur. J. Biochem. 37, 69-77 (1973)
- 55) RIS, M.M., R.A. DEITRICH und J.P. VON WARTBURG: Inhibition of Aldehyde-Reduktase Isoenzymes in Human and Rat Brain.
Biochem. Pharmacol. 24, 1865-1869 (1975)
- 56) RUTLEDGE, C.O., J.J. JONASON: Metabolic Pathways of Dopamine and Norepinephrine in Rabbit Brain in Vitro.
J. Pharmac. exp. Ther. 157, 493-502 (1967)
- 57) SABELLI, H.C., W.J. GIARDINA, S.G.A. ALIVISATOS, P.K. SETH und F. UNGAR: Indolacetaldehydes: Serotonin-like Effects on the Central Nervous System.
Nature 223, 73-74 (1969)
- 58) SCHANBERG, S.M., J.J. SCHILDKRAUT, G.R. BREESE, I.J. KOPIN: Metabolism of Normetanephine-³H in Rat Brain. - Identification of conjugated 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol as the major Metabolite.
Biochem. Pharmacol. 17, 247-254 (1968)
- 59) SEILER, N., L. DEMISCH, H. SCHNEIDER: Biochemie und Funktion von biogenen Aminen im Zentralnervensystem.
Angewandte Chemie 83. Jhrgg. Heft 2, 53-88 (1971)

- 60) SIEGEL, J. M., G. A. MONTGOMERY, R. M. BOCK: Ultraviolet Absorption Spectra of DPN and Analogs of DPN.
Arch. Biochem. Biophys. 82, 288-299 (1959)
- 61) TABAKOFF, B., V. G. ERWIN: Purification and Characterization of a Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-linked Aldehyd-Reduktase from Brain.
J. Biol. Chem. 245, 3263-3268 (1970)
- 62) TABAKOFF, B., R. ANDERSON, F. UNGAR, S. G. A. ALIVISATOS: Disposition of Biogenic Aldehydes: Oxidation or Reduction Depends on Chemical Structure.
Trans. Am. Soc. Neurochem. 3, Abstr. 126 (1972)
- 63) TABAKOFF, B., R. ANDERSON, S. G. A. ALIVISATOS: Enzymatic Reduction of "Biogenic" Aldehyds in Brain.
Molec. Pharmacol. 9, 428-437 (1973)
- 64) TABAKOFF, B., C. VUGRINCIC, R. ANDERSON, S. G. A. ALIVISATOS: Reduction of Chloralhydrate to Trichloroethanol in brain extracts.
Biochem. Pharmacol. 23, 455-460 (1974)
- 65) TABAKOFF, B.: Inhibition of Sodium, Potassium, and Magnesium Activated ATPase by Acetaldehyd and Biogenic Aldehydes.
Res. Comm. clin. Path. Pharmac. 7, 621-624 (1974)
- 66) TABAKOFF, B., W. GROSKOPF, R. ANDERSON, S. A. G. ALIVISATOS: Biogenic Aldehyd Metabolism - Relation to Pentose Shunt Activity in Brain.
Biochem. Pharmacol. 23, 1707-1719 (1974)
- 67) THEORELL, H., B. CHANCE: Studies on Liver Alcohol Dehydrogenase. II. The Kinetics of the Compound of Horse Liver Alcohol Dehydrogenase and Reduced Diphosphopyridine Nucleotide.
Acta chem. scand. 5, 1127-1144 (1951)

- 68) TURNER, A. J., K. F. TIPTON: The Purification and Properties of an NADPH-linked Aldehyd-Reduktase from Pig Brain.
Eur. J. Biochem. 30, 361-368 (1972)
- 69) TURNER, A. J., K. F. TIPTON: a) The Separation of Two Aldehyde Reduktases from Pig Brain.
Biochem. J. 128, 93 P - 94 P (1972)
- b) The Characterization of Two Reduced NADPH-linked Aldehyd-Reduktases from Pig Brain.
Biochem. J. 130, 765-772 (1972)
- 70) TURNER, A. J., P. E. HICK: Inhibition of Aldehyd-Reduktase by acidic metabolites of the biogenic amines.
Biochem. Pharmacol. 24, 1731-33 (1975)
- 71) v. WARTBURG, J. P. in: The Biology of Alcoholism.
(Kissin, B., Begleiter, H., eds.) 1, 63 (1971)
- 72) WILK, S.: Studies on the Detection of 3-methoxy-4-hydroxyphenyl-ethanol in Human Cerebrospinal Fluid.
Biochem. Pharmacol. 20, 2095-2096 (1971)
- 73) WILLIAMS, R. T.: Detoxication Mechanism.
Chapman & Hall, London (1959)

Herrn Prof. Dr. Helmut Coper danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die wertvolle Hilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Wolfram Christ für seine geduldige Betreuung bei der praktischen Durchführung und für seine stete Bereitschaft, anstehende Probleme zu diskutieren.

Ebenso gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Institutes, die zur Lösung praktischer Probleme beitrugen.

Dank auch Herrn Hoffmann für die sorgfältige Durchführung der graphischen Arbeiten.

LEBENS LAUF

Am 3. 5. 1947 wurde ich als Sohn des Schmiedemeisters Josef Kuhr und seiner Ehefrau Resi, geb. Willebrand, in Borgloh, Krs. Osnabrück, geboren.

Von 1952 bis 1957 besuchte ich die dortige Volksschule und anschließend das Gymnasium Carolinum in Osnabrück, an dem ich im Februar 1966 die Reifeprüfung des humanistischen Zweiges ablegte.

Nach einem Semester Jurastudium an der Universität Münster leistete ich den Wehrdienst.

Im Sommersemester 1968 begann ich mein Medizinstudium an der Freien Universität Berlin, wo ich im August 1974 das Staatsexamen bestand.

Meine Medizinalassistentenzeit absolvierte ich in der Inneren Abteilung des Behring-Krankenhauses, in der Chirurgischen Abteilung des Neuköllner Krankenhauses und am Institut für Neuropsychopharmakologie, um die im Studium begonnenen Arbeiten zur Promotion fortzuführen.

Nach meiner Approbation als Arzt im März 1976 war ich zunächst in der Chirurgischen Abteilung des Wenckebach-Krankenhauses tätig und bin z. Zt. als Assistenzarzt auf der Inneren Abteilung des Krankenhauses Bethel beschäftigt.

